



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»
(ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»)

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ & ΡΑΔΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ &
ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ (ΙΠΡΕΤΕΑ)

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΑ

**Αντισώματα Υ έναντι του ενδογενούς πολυπεπτιδίου
προθυμοσίνη άλφα (ProTα)**

**Antibodies Y against the endogenous polypeptide
prothymosin alpha (ProTα)**



Επιβλέπων καθηγητής : Δημήτριος Κουρέτας

Λάρισα 2018

Αντισώματα Υ έναντι του ενδογενούς πολυπεπτιδίου προθυμοσίνη άλφα (ProTα)

Antibodies Υ against the endogenous polypeptide prothymosin alpha (ProTα)

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΑ

Επιβλέπων καθηγητής :

Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών -Τοξικολογίας.

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών -Τοξικολογίας.

Δημήτριος Στάγκος, Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας.

Ευαγγελία Λιβανίου, Ερευνήτρια Α', ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Λιβανίου για τη δυνατότητα που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της εργαστηριακής της ομάδας, την υποστήριξή της και τον χρόνο που διέθεσε για να φέρουμε σε πέρας την παρούσα μελέτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κύριο Κουρέτα για την τιμή να είναι ο επιβλέπωντας καθηγητής της παρούσας μελέτης, αλλά και για την κατανόηση, την εμπιστοσύνη και την χαρά για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Στάγκο για την τιμή να αποτελεί μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής αυτής της μελέτης.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα Χρυσούλα Καραχάλιου για τις πολύτιμες συμβουλές της και την προθυμία της να μου λύνει κάθε απορία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στηρίζει πάντα στο να φέρω σε πέρας τους στόχους μου και μού δίνει τη δυνατότητα να σπουδάζω.

Αντισώματα Υ έναντι του
ενδογενούς πολυπεπτιδίου
προθυμοσίνη άλφα (ProΤα)

2018

Αδαμαντία Αναστασιάδου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗσελ.8

ABSTRACT.....σελ.10

ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....σελ.12

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 :ΤΟ ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ ΑΛΦΑ

1.1 Θύμος αδένας.....σελ.13

1.2 Θυμοσίνεςσελ.14

1.3 Προθυμοσίνη άλφα.....σελ.15

1.3.1 Ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά της ProTa.....σελ.15

1.3.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός τηςProTaσελ.18

1.3.3 Ενδοκυτταρικός ρόλος της ProTa.....σελ.18

1.3.3.1 Ο ρόλος της ProTa στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης..σελ.18

1.3.3.2 Ο ρόλος της ProTa στο οξειδωτικό stress.....σελ.20

1.3.3.3 Ο ρόλος της ProTa στην απόπτωση.....σελ.20

1.3.3.4 Η ProTa ως πιθανός καρκινικός δείκτης.....σελ.21

1.3.4 Ο εξωκυτταρικός ρόλος της ProTa.....σελ.23

1.3.4.1 Εξωκυτταρική δράση της ProTa: ο ρόλος του C-τελικού δεκαπεπτιδίου [100-109].....σελ.23

1.3.4.2 Εξωκυτταρική δράση της ProTa: πιθανοί υποδοχείς.....σελ.24

1.3.4.3 Εξωκυτταρική δράση της ProTa: πιθανές προοπτικές.....σελ.25

1.3.5 Μελέτη της ProTa με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων.....σελ.27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ - ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ Υ

2.1 Το Ανοσοποιητικό σύστημα.....σελ.29

2.1.1 Έμφυτη και ειδική ανοσία.....σελ.29	σελ.29
2.2Αντιγόνα.....σελ.31	σελ.31
2.3 Αντισώματα.....σελ.32	σελ.32
2.3.1 ΑντισώματαΥ.....σελ.33	σελ.33
2.3.2 Ορισμοί - Χαρακτηριστικά Αντισωμάτων.....σελ.35	σελ.35
2.3.3 Τιτλοδότηση αντισωμάτων με μέθοδο ELISA.....σελ.36	σελ.36

ΣΚΟΠΟΣ	σελ.39
---------------------	---------------

ΜΕΡΟΣ Β:ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....σελ.40	σελ.40
---	---------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ELISA

3.1 Όργανα και υλικά.....σελ.41	σελ.41
3.2 Αντισώματα.....σελ.43	σελ.43
3.3 Πειραματικό πρωτόκολλο.....σελ.44	σελ.44
3.3.1 Πρωτόκολλο Ι.....σελ.44	σελ.44
3.3.2 Πρωτόκολλο ΙΙ.....σελ.45	σελ.45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Αποτελέσματα πειραμάτων τιτλοδότησης ELISA.....σελ.46	σελ.46
4.1.1 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι Τα1/KLH με επίστρωση διαλύματος ProTa 0,1 µg/ml.....σελ.47	σελ.47
4.1.2 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι Τα1/KLH με επίστρωση διαλύματος Τα1 0,1 µg/ml	σελ.48
4.1.3 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProTa με επίστρωση διαλύματος ProTa 0,1 µg/ml.....σελ.49	σελ.49
4.1.4 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProTa με επίστρωση διαλύματος Τα1 0,1 µg/ml	σελ.50

4.1.5 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProTa/KLH με επίστρωση διαλύματος ProTa 0,1 µg/ml.....σελ.51	σελ.51
4.1.6 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProTa/KLH με επίστρωση διαλύματος Τα1 0,1 µg/mlσελ.52	σελ.52
4.1.7 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProTa[100-109] με επίστρωση διαλύματος ProTa 0,1 µg/ml.....σελ.53	σελ.53
4.1.8 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProTa[100-109] με επίστρωση διαλύματος Τα1 0,1 µg/ml.....σελ.54	σελ.54
4.1.9 Συγκεντρωτικό διάγραμμα τιτλοδοτήσεων αντισωμάτων με επίστρωση ProTa 0,1 µg/ml.....σελ.55	σελ.55

ΜΕΡΟΣ Γ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.56	σελ.56
-------------------------------------	--------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.62	σελ.62
--------------------------------	--------

ΕΝΘΕΤΟσελ.68	σελ.68
---------------------------	--------

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προθυμοσίνη άλφα (ProTa) είναι ένα πολυπεπτίδιο με αλληλουχία 109 αμινοξέων στον άνθρωπο (M.B. ~12 kDa), που παρουσιάζει υψηλή διατήρηση δομής μεταξύ των θηλαστικών. Η αρχική της απομόνωση έγινε το 1984 από θύμο αδένα αρουραίου. Η ProTa παρουσιάζει διττό βιολογικό ρόλο, τόσο ενδοκυτταρικό, όσο και εξωκυτταρικό.

Ενδοκυτταρικά εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και, πιθανόν, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και στην αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης, ελέγχοντας έμμεσα την έκφραση των γονιδίων και κατ' επέκταση την ίδια την επιβίωση του κυττάρου. Ακόμη, εμπλέκεται στην αναστολή της απόπτωσης και στην επαγωγή κυτταροπροστατευτικών μηχανισμών έναντι του οξειδωτικού stress. Εξωκυτταρικά η ProTa ενισχύει την κυτταρομεσολαβητική ανοσία. Σύμφωνα με πειραματικά αποτελέσματα της τελευταίας δεκαετίας, η ανοσοδραστική περιοχή του μορίου εδράζεται στο C-τελικό δεκαπεπτίδιο (ProTa[100-109]), ωστόσο έχει επίσης αναφερθεί ότι το N-τελικό 28-πεπτίδιο (ProTa[1-28] ή αλλιώς Ta1) παρουσιάζει έντονη ανοσοενισχυτική δράση.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση αντισωμάτων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία μελέτης της ProTa. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν αντισώματα Υ, τα οποία είχαν αναπτυχθεί παλαιότερα σε πτηνά (όρνιθες ωοτοκίας) και είχαν απομονωθεί από κρόκο αυγού στα εργαστήρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Τα αντισώματα αυτά είχαν αναπτυχθεί εναντίον συνθετικών πεπτιδίων από την αμινοξική αλληλουχία της ProTa (τμήματα [1-28] και [100-109]), μετά από σύζευξή τους στην πρωτεΐνη-φορέα KLH, ή εναντίον ακέραιης ProTa, μετά από σύζευξή της στην KLH ή σε ασύζευκτη μορφή. Αναλυτικά, αξιολογήθηκαν τέσσερα διαφορετικά αντισώματα Υ, με κωδικούς IgY1, IgY2, IgY3 και IgY4, που είχαν αναπτυχθεί, αντίστοιχα, εναντίον: ProTa[1-28]/KLH ή Ta1/KLH (IgY1), ProTa (IgY2), ProTa/KLH (IgY3), και, ProTa[100-109]/KLH (IgY4).

Τα αντισώματα Υ αξιολογήθηκαν με πειράματα τιτλοδότησης ELISA. Όπως προέκυψε από τα πειραματικά αποτελέσματα, τα αντισώματα

IgY3 παρουσιάζουν τον υψηλότερο τίτλο ως προς την ProTa και προτείνεται να αξιολογηθούν περαιτέρω. Τα αντισώματα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία ποιοτικού εντοπισμού/ποσοτικού προσδιορισμού της ProTa σε ειδικά βιολογικά δείγματα, μέσω μεθόδων ανοσοκυτταρολογίας, ανοσοϊστοχημείας, τεχνικών Western blot, τεχνικών ανοσοανάλυσης, κ.λπ., με στόχο την περαιτέρω μελέτη αυτού του σημαντικού ενδογενούς πολυπεπτιδίου.

ABSTRACT

Human prothymosin alpha (ProT α) is a 109-amino acid polypeptide (MW: ~ 12 kDa), the primary structure of which is highly conserved among mammalian organisms. ProT α was first isolated from rat thymus gland in 1984. Now-a-days it is well established that ProT α has a dual, important, intracellular and extracellular role. Intracellularly, ProT α has been associated with cell proliferation and, probably, cell-cycle regulation mechanisms, while it has also been involved in chromatin remodeling, thus indirectly affecting gene transcription and overall cell survival processes. Moreover, ProT α has been reported to inhibit cell apoptosis and induce cytoprotective mechanisms against oxidative stress. Extracellularly, ProT α has been reported to enhance the cell-mediated immunity. According to experimental findings of the last decade, the immunoreactive region of ProT α seems to be located in the C-terminal decapeptide, ProT α [100-109]; however, the N-terminal 28-mer peptide, ProT α [1-28], also known as T α 1, has been also reported to present a strong immunostimulating action.

The main objective of the present work was to evaluate a series of in-house developed antibodies that might be used as laboratory tools in further research concerning ProT α . More specifically, antibodies Y against ProT α or various derivatives of the polypeptide, which had been previously developed in avian species (laying hens) and isolated from the immune egg yolk, were evaluated in the frame of the present work. These antibodies have been developed against synthetic peptides of the ProT α – sequence (fragments [1-28] and [100-109]), conjugated to the carrier-protein KLH, or, against intact ProT α , either conjugated to KLH or non-conjugated. Actually, four different antibodies Y (IgY1, IgY2, IgY3, IgY4), which had been developed against ProT α [1-28]/KLH (IgY1), ProT α (IgY2), ProT α /KLH (IgY3) and ProT α [100-109]/KLH (IgY4), were evaluated with ELISA titer experiments. As revealed, the highest titer has been obtained with the IgY3 antibodies, which are proposed to be more thoroughly studied. These antibodies might be applied as laboratory tools enabling qualitative detection and/or quantitative determination of ProT α in various biological samples, through immunocytology,

immunocytochemistry, Western-blot, immunoassay, etc., techniques, thus contributing to further elucidation of ProTα's important biological role.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Θύμος αδένας



Σχήμα 1.1. Οι λοβοί του θύμου αδένα (δεξιός-αριστερός)

Ο θύμος αδένας (γενική βιβλιογραφία: Zdrojewicz *et al.*, 2016) αποτελείται από δύο λοβούς, τον αριστερό και τον δεξιό (Σχήμα 1.1), οι οποίοι είναι πανομοιότυποι και βρίσκονται είτε ενωμένοι, είτε διαχωρισμένοι. Το μέγεθος του θύμου αδένα αυξάνει κατά την παιδική ηλικία και κορυφώνεται κατά την εφηβεία, φτάνοντας σε βάρος από 20 g έως και 37 g. Έπειτα, ο θύμος σιγά σιγά συρρικνώνεται και τελικά εκφυλίζεται σε μικρές νησίδες λίπους. Οι δύο πλευρικοί λοβοί του θύμου αδένα βρίσκονται στο πρόσθιο ανώτερο μεσοθωράκιο τμήμα και εκτείνονται από τον τέταρτο πλευρικό χόνδρο προς τα πάνω, φτάνοντας το κατώτερο όριο του θυρεοειδή αδένα. Ο θύμος καλύπτεται από το στέρνο, στηριζόμενος επί του περικαρδίου. Διαχωρίζεται από το αορτικό τόξο και τα μεγάλα αγγεία από ένα στρώμα περιτονίας. Αρχικά, ο θύμος αδένας θεωρήθηκε πως δεν διαδραματίζει ιδιαίτερο ρόλο στη λειτουργία του οργανισμού. Αργότερα, όμως, περί το 1960, έγινε γνωστό πως αποτελεί πρωτογενές λεμφικό όργανο του ανοσοποιητικού συστήματος και διαδραματίζει καίριο ρόλο στην ανάπτυξη των Τ-λεμφοκυττάρων (1). Συγκεκριμένα, ο θύμος αδένας παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον όπου τα Τ-λεμφοκύτταρα ωριμάζουν, δηλαδή αποκτούν αντιγονική εξειδίκευση. Αυτές του οι ιδιότητες υποστηρίχτηκαν από τα αποτελέσματα πειραματικών θυμεκτομών κατά τη δεκαετία 1960, που οδήγησαν σε μείωση των πληθυσμών των Β- και Τ-λεμφοκυττάρων, της παραγωγής αντιγόνων και της απόρριψης

ασύμβατων μοσχευμάτων. Αργότερα, εντοπίστηκαν στο θύμο ποικίλοι βιολογικά ενεργοί παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί θεωρήθηκε ότι έχουν προοπτική θεραπευτικής εφαρμογής για άτομα με ανεπάρκεια λειτουργικότητας του θύμου, ενώ, επιπλέον, θα μπορούσαν να ενισχύσουν την ένταση της ανοσολογικής απόκρισης σε μη νοσούντα άτομα.

1.2 Θυμοσίνες

Περί το 1960 απομονώθηκε και μελετήθηκε ένα βιοδραστικό εκχύλισμα από θύμο αδένά μόσχου (γενική βιβλιογραφία: Βασιλειάδου, 2017) (2), από τους Goldstein και συνεργάτες, το οποίο και ονόμασαν θυμοσινικό κλάσμα 5, ή αλλιώς TF5 (Thymosin Fraction 5). Όπως απεδείχθη έπειτα από *in vitro* μελέτες, το TF5 είχε τη δυνατότητα να διεγείρει τα λεμφοκύτταρα ανοσοκατεσταλμένων ανθρώπων, αποκαθιστώντας τη λειτουργικότητα των λεμφοκυττάρων στο φυσιολογικό επίπεδο (3).

Οι επιστήμονες αρχικά θεώρησαν ότι το TF5 περιέχει ένα μοναδικό πολυπεπτίδιο (4). Αργότερα, ωστόσο, απεδείχθη ότι το TF5 περιείχε μείγμα πεπτιδίων, συγκεκριμένα 30-40 διακριτά πεπτίδια με M.B. 1.000 έως 15.000 Da (3). Τα πεπτίδια αυτά ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες βάσει του ισοηλεκτρικού τους σημείου (pI). Συγκεκριμένα, ταξινομήθηκαν σε θυμοσίνες άλφα (pI: <5), θυμοσίνες βήτα (pI: 5-7) και θυμοσίνες γάμμα (pI: >7) (5). Προς καθορισμό της σειράς ταυτοποίησης του κάθε πεπτιδίου της ίδιας ομάδας χρησιμοποιήθηκε ο αντίστοιχος αύξων αριθμός.

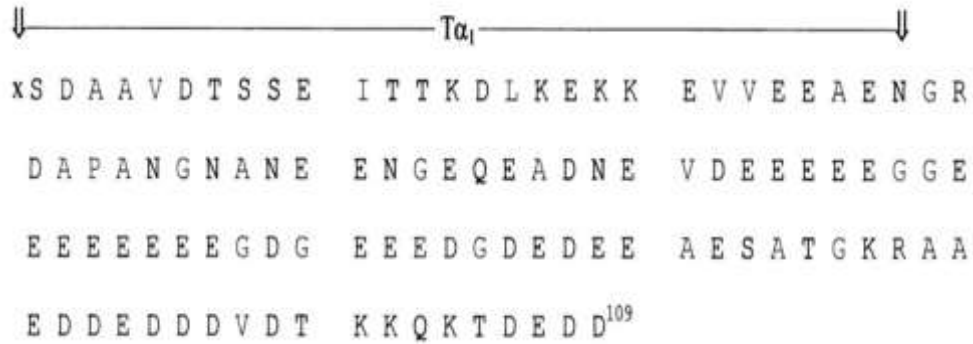
Πρώτα, το 1977, απομονώθηκε από το TF5 η θυμοσίνη άλφα 1 ή Τα1 (6), η οποία βρέθηκε ότι είναι έως και 1.000 φορές δραστικότερη ολόκληρου του TF5. Η Τα1 αποτελείται από 28 αμινοξέα και έχει M.B. 3.108 Da. Όσον αφορά στην πρωτοταγή της δομή, στο N-τελικό άκρο της διαθέτει σερίνη που είναι ακετυλιωμένη, ενώ από την αμινοξική της αλληλουχία απουσιάζουν αρωματικά αμινοξέα.

Αργότερα απομονώθηκαν άλλα δυο πεπτίδια του TF5, η θυμοσίνη άλφα 11 (Τα11) και το πεπτίδιο des-[25-28]-Τα1 (7). Το καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου des-[25-28]-Τα1 περιέχει τέσσερα αμινοξέα λιγότερο, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο της Τα11 περιέχει επτά αμινοξέα παραπάνω σε σχέση με την Τα1. Από αυτήν την παρατήρηση προέκυψε η υπόθεση ύπαρξης ενός μεγαλύτερου πρόδρομου μορίου. Όντως, στις αρχές της δεκαετίας του 1980, οι Haritos και συνεργάτες απομόνωσαν από θύμο αδένα αρουραίου ένα πολυπεπτίδιο μήκους 111 αμινοξέων, τα N-τελικά, πρώτα 28 αμινοξέα του οποίου ήταν ταυτόσημα με αυτά της Τα1 (8,9). Το πολυπεπτίδιο αυτό ονομάστηκε προθυμοσίνη άλφα (ProΤα). Η υπόθεση ότι η ProΤα αποτελεί πρόδρομο μόριο της Τα1 φαίνεται να επιβεβαιώνεται από μελέτες, που απέδειξαν πως η Τα1 δημιουργείται ενδοκυτταρικά με πρωτεολυτική διάσπαση της ProΤα από το ένζυμο asparaginyl endopeptidase (10). Ωστόσο, υπάρχει επίσης η άποψη πως η Τα1, όπως και τα πεπτίδια Τα11 και des-[25-28]-Τα1, προκύπτουν όχι ενδοκυτταρικά, αλλά κατά την *in vitro* επεξεργασία του TF5.

1.3 Προθυμοσίνη άλφα (ProΤα)

1.3.1 Ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά της ProΤα

Η πρώτη αλληλουχία της ProΤα που αναφέρει η βιβλιογραφία προκύπτει από την απομόνωση του πολυπεπτιδίου από θύμο αρουραίου (9) και έπειτα ανθρώπου (11). Η ProΤα ανθρώπου είναι μήκους 109 αμινοξέων (isoform-2, Σχήμα 1.2) και Μ.Β. ~12 kDa. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί είναι το *PTMA* του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 2 (2q 37.1) (12).



Σχήμα 1.2. Αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης ProTa (P06454-2).

Η αλληλουχία της Ta1 είναι ταυτόσημη με αυτήν του N-τελικού 28-πεπτιδίου της ProTa. Η N-τελική σερίνη της ProTa είναι ακετυλιωμένη (x = ακετυλομάδα).

(Ανατύπωση από Καππά και συν., 2013: αναφορά 27)

Όσον αφορά στην κεντρική αμινοξική της αλληλουχία, η ProTa είναι πλούσια σε ασπαρτικό και γλουταμικό οξύ, εξ ου και το πολύ χαμηλό ισοηλεκτρικό της σημείο ($pI = 3,55$) (8) και ο ιδιαίτερα όξινος χαρακτήρας της. Κυρίως λόγω της πληθώρας όξινων καταλοίπων στην κεντρική περιοχή του μορίου, το πολυπεπτίδιο αποκτά ακανόνιστη δομή στο χώρο, δεν παρουσιάζει δηλαδή συγκεκριμένες ανώτερες δομές (δευτεροταγείς / τριτοταγή). Πιθανότατα, η ProTa αποκτά συγκεκριμένη διαμόρφωση στο χώρο κατά την αλληλεπίδρασή της με άλλα μόρια, π.χ. υποδοχείς (13).

Παρόλο που η ProTa απομονώθηκε για πρώτη φορά από θύμο αδένος και θεωρήθηκε «θυμική ορμόνη», απεδείχθη στη συνέχεια πως εντοπίζεται σε όλους τους υπόλοιπους ιστούς (14) και τα όργανα, παραδείγματος χάριν στο ήπαρ, στους πνεύμονες και στο σπλήν. Ακόμα, παρόλο που η ProTa πρωτο-απομονώθηκε από θύμο αδένος αρουραίου, απαντάται στους ιστούς και τα όργανα όλων των θηλαστικών. Μάλιστα, η ProTa χαρακτηρίζεται από υψηλή εξελικτική συντηρητικότητα της πρωτοταγούς της δομής μεταξύ των διαφόρων ειδών των θηλαστικών (Σχήμα 1.3) (15).

	10	20	30	40
<i>B. taurus</i>	SDAAVDTSSSE	ITTKDLKEKK	EVVEEAENGR	EAPANGNA-N
<i>H. sapiens</i>	SDAAVDTSSSE	ITTKDLKEKK	EVVEEAENGR	DAPANGNAEN
<i>M. musculus</i>	SDAAVDTSSSE	ITTKDLKEKK	EVVEEAENGR	DAPANGNAQN
<i>R. norvegicus</i>	SDAAVDTSSSE	ITTKDLKEKK	EVVEEAENGR	DAPANGNAQN
<i>S. scrofa</i>	SDAAVDTSSSE	ITTKDLKEKK	EVVEEAENGR	EAPANGNA-N
	*****	*****	*****	:***** *
	50	60	70	80
<i>B. taurus</i>	EENGEQEADN	EVDEEEEEGG	EEEEEEEEGD	GEEEDGDEDE
<i>H. sapiens</i>	EENGEQEADN	EVDEEEEEGG	EEEEEEEEGD	GEEEDGDEDE
<i>M. musculus</i>	EENGEQEADN	EVDEEEEEGG	EEEEEEEEGD	GEEEDGDEDE
<i>R. norvegicus</i>	EENGEQEADN	EVDEEEEEGG	EEEEEEEEGD	GEEEDGDEDE
<i>S. scrofa</i>	EENGEQEADN	EVDEEEEEGG	EEEEEEEEGD	GEEEDGDEDE
	*****	*****	*****	*****
	90	100	110	
<i>B. taurus</i>	EAEAAATGKRA	AEDDEDDDDVD	TKKQK-TDED D	
<i>H. sapiens</i>	EAEAAATGKRA	AEDDEDDDDVD	TKKQK-TDED D	
<i>M. musculus</i>	EAEAPTGKRV	AEDDEDDDDVD	TKKQK-TEED D	
<i>R. norvegicus</i>	EAEAPTGKRV	AEDDEDDDVE	TKKQKKTDED D	
<i>S. scrofa</i>	EAEAAATGKRA	AEDDEDDDDVD	TKKQK-TDED D	
	:*	*****:	*****:***	

* Ταυτόσημα αμινοξικά κατάλοιπα, : Αμινοξικά κατάλοιπα με ταυτόσημες χημικές ιδιότητες, . Αμινοξικά κατάλοιπα με παρόμοιες χημικές ιδιότητες

Σχήμα 1.3. Αμινοξική αλληλουχία της ProTa σε διάφορα είδη θηλαστικών.
(Ανατύπωση από Καππά και συν., 2013: αναφορά 27)

Από το μόριο της ProTa απουσιάζει πεπτίδιο – οδηγητής για έκκριση εκτός του κυττάρου (13). Εντούτοις, στο μόριο της ProTa περιέχονται δύο αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLS), οι K⁸⁷R⁸⁸ και T¹⁰⁰KKQKT¹⁰⁵ (16,17). Μέσω αυτών των αλληλουχιών το πολυπεπτίδιο οδηγείται στον πυρήνα. Αυτό επιβεβαιώθηκε πειραματικά, μέσω μεταλλάξεων στα τμήματα του διμερούς NLS, οι οποίες και οδηγούσαν σε εντοπισμό της ProTa στο κυτταρόπλασμα.

1.3.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός της ProTa

Όπως γνωρίζουμε σήμερα, το μόριο της ProTa περιέχει διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού, επομένως αναμένεται να βρίσκεται στον πυρήνα. Επιπροσθέτως, η ProTa έχει πολύ όξινο χαρακτήρα, όπως έχουν πολλές πυρηνικές πρωτεΐνες, γεγονός που συνηγορεί στον πυρηνικό εντοπισμό της. Ο πυρηνικός εντοπισμός της ProTa αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1988, οπότε και βρέθηκε ότι το πολυπεπτίδιο συντελεί στην οργάνωση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων του γενετικού υλικού (18). Ακόμα, το πολυπεπτίδιο στερείται σήματος έκκρισης εκτός κυττάρου (13). Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στην άποψη πως η ProTa εντοπίζεται αποκλειστικά και μόνο στον πυρήνα (19). Εντούτοις, με βάση περαιτέρω πειραματικά αποτελέσματα, σήμερα οι περισσότεροι ερευνητές πιστεύουν ότι το πολυπεπτίδιο έχει την ικανότητα να μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (20). Την ικανότητα αυτή η ProTa πιθανόν να οφείλει, μεταξύ άλλων, στο μικρό της μέγεθος και στις αλληλεπιδράσεις της με πρωτεΐνες – μεταφορείς μορίων από και προς τον πυρήνα, όπως είναι η Rch-1, η Ran και η καρυοφερίνη-β (21).

1.3.3 Ο ενδοκυτταρικός ρόλος της ProTa

1.3.3.1 Ο ρόλος της ProTa στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης

Όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, εντός του κυττάρου η ProTa συντελεί/συμμετέχει σε ζωτικής σημασίας λειτουργίες, όπως η αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης (μέσω της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου με την ιστόνη H1), η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σε κύτταρα με έντονο πολλαπλασιασμό παρατηρείται υπερέκφραση του *PTMA* γονιδίου (22).

Όσον αφορά στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, το πολυπεπτίδιο αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1 μέσω της κεντρικής όξινης περιοχής του,

(A) Η H1 προσδένεται στα νουκλεοσώματα, συμπυκνώνοντας την ευχρωματίνη σε

(Ανατύπωση από Καππά και συν., 2013: αναφορά 27).

χρωματίνης, ελέγχει εν μέρει την έκφραση των γονιδίων και συνεπώς την παραγωγή των πρωτεϊνών.

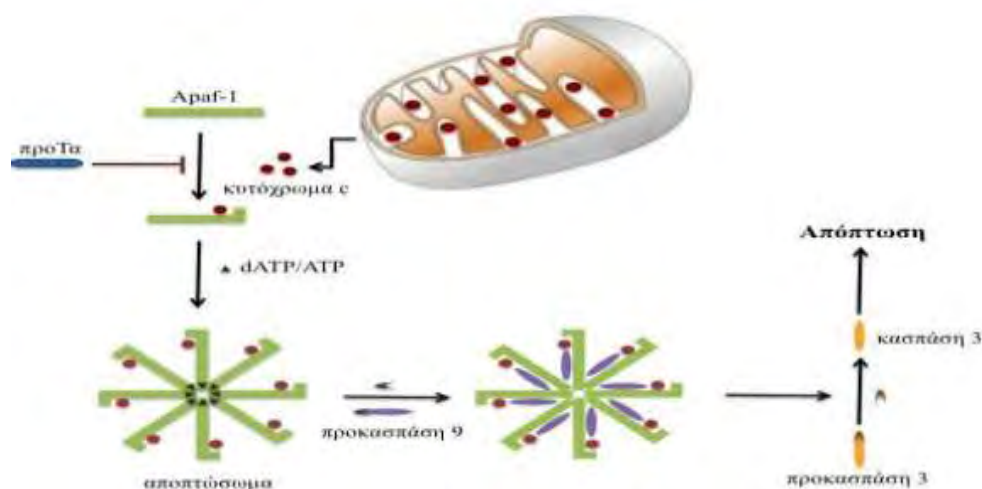
1.3.3.2 Ο ρόλος της ProTα στο οξειδωτικό stress

Η ProTα είναι πιθανόν να λειτουργεί ως διακόπτης επαγωγής/τερματισμού κυτταρο-προστατευτικών μηχανισμών (28,29), όπως αυτοί στους οποίους συμμετέχει ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2. Συγκεκριμένα, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, το σύμπλεγμα του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 με την πρωτεΐνη Keap1 (Kelch –like ECH –associated protein 1) μεταφέρεται συνεχώς μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Όταν βρεθεί στον πυρήνα, το σύμπλεγμα Nrf2/Keap1 «προσβάλλεται» από την πυρηνική ProTα, που αλληλεπιδρά με την Keap1, με αποτέλεσμα να απομακρύνεται από το σύμπλεγμα ο παράγοντας Nrf2, ο οποίος στη συνέχεια κατευθύνεται σε κυτταροπροστατευτικά γονίδια – στόχους και ενεργοποιεί τη μεταγραφή τους. Η απελευθέρωση του Nrf2 είναι μόνον μερική (partial) στα φυσιολογικά κύτταρα, ώστε να εξασφαλίζεται ένα βασικό επίπεδο μεταγραφής, είναι όμως εξαιρετικά πιο εκτεταμένη σε κύτταρα υπό συνθήκες stress, λόγω προηγηθείσας αποσταθεροποίησης του συμπλέγματος Nrf2/Keap1. Όταν αποκατασταθούν οι φυσιολογικές συνθήκες, η περίσσεια του ελεύθερου Nrf2 οδηγείται εκτός πυρήνα, μέσω πρόσδεσης στην πρωτεΐνη-μεταφορέα Keap1, επειδή το σύμπλεγμα Nrf2/Keap1 είναι τώρα σταθεροποιημένο και λιγότερο «ευάλωτο» σε «προσβολή» από την ProTα.

1.3.3.3 Ο ρόλος της ProTα στην απόπτωση

Η ProTα αναστέλλει την απόπτωση εμποδίζοντας τη συγκρότηση του αποπτωσώματος στο κυτταρόπλασμα. Φυσιολογικά, για να σχηματιστεί το αποπτώσωμα, συνδέονται ο ενεργοποιητικός παράγοντας των πρωτεασών της απόπτωσης Araf-1 (apoptotic protease activating factor) και το κυτόχρωμα c, που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια (30). Αποτέλεσμα του σχηματισμού του αποπτωσώματος είναι η πυροδότηση ενός καταρράκτη κασπασών, ο οποίος και τελικά οδηγεί

στην κασπάση - τελεστή του κυτταρικού θανάτου, την κασπάση 3. Ο καταρράκτης αυτός ξεκινά από την ενεργοποίηση της κασπάσης 9, που θα ενεργοποιήσει με τη σειρά της την προ-κασπάση 3 οδηγώντας στην κασπάση 3. Η ProTa προλαμβάνει το σχηματισμό του αποπτωσώματος εμποδίζοντας τη σύνδεση του κυτόχρωματος c στον Araf-1 (Σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5. Η ProTa αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση.

Προς ενεργοποίηση της απόπτωσης, το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται από την μεμβράνη του μιτοχονδρίου προς τον κυτταροπλασματικό χώρο για να συνδεθεί με τον Araf-1, οδηγώντας στο σχηματισμό του αποπτωσώματος, οπότε πυροδοτείται η ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κασπασών, με τελικό προϊόν την κασπάση 3, τελεστή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η ProTa παρεμποδίζει τη σύνδεση του Araf-1 με το κυτόχρωμα c και, με τον τρόπο αυτό, αναστέλλει την απόπτωση.

(Ανατύπωση από Καππά και συν., 2013: αναφορά 27)

1.3.3.4 Η ProTa ως πιθανός καρκινικός δείκτης

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ProTa πιθανόν να συντελεί στη διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς, αλληλεπιδρώντας με την ιστόνη H1 προκαλεί από-ελίκωση των νουκλεοσωμάτων και οδηγεί στο σχηματισμό ευχρωματίνης. Ο καρκίνος, από την άλλη πλευρά, χαρακτηρίζεται συνήθως από υπέρμετρο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Συνεπώς, εύλογα γεννιέται η σκέψη ότι τα

ενδοκυτταρικά επίπεδα της ProTa ή/και τα επίπεδα του πολυπεπτιδίου στα βιολογικά υγρά θα μπορούσαν να αποτελέσουν διαγνωστικό καρκινικό δείκτη (31). Όντως, υψηλά επίπεδα έκφρασης τόσο της ProTa, όσο και του mRNA (31) της έχουν παρατηρηθεί σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (Πίνακας 1.1), και αρκετές φορές τα επίπεδα έκφρασης του πολυπεπτιδίου σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης του *c-MYC* πρωτο-ογκογονιδίου (22,31), γεγονός που ενισχύει ακόμη περισσότερο την αρχική υπόθεση.

Πίνακας 1.1. Είδη καρκίνου, στα οποία έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση ProTa.

Είδος καρκίνου	Βιβλιογραφική παραπομπή
Θυρεοειδούς	Kashat <i>et al.</i> , 2010 (32) Letsas <i>et al.</i> , 2007 (33)
Μαστού	Tsitsiloni <i>et al.</i> , 1993 (34)
Ορθού	Ojima <i>et al.</i> , 2007 (35)
Ήπατος	Fraga <i>et al.</i> , 1993 (36) Wu <i>et al.</i> , 1997 (37)
Νευροβλαστώματος	Sasaki <i>et al.</i> , 2001 (38)
Ανώτερου ουροποιητικού συστήματος	Jou <i>et al.</i> , 2009 (39)
Εντέρου	Tsitsiloni <i>et al.</i> , 1993 (40)
Παχέος εντέρου	Mori <i>et al.</i> , 1993 (41)

1.3.4 Ο εξωκυτταρικός ρόλος της ProTa

1.3.4.1 Εξωκυτταρική δράση της ProTa: ο ρόλος του C-τελικού δεκαπεπτιδίου [100-109]

Για να εξηγηθεί και να μελετηθεί η εξωκυτταρική δράση της ProTa, οι Skoreliti και συνεργάτες θέλησαν να βρουν σε ποια αμινοξέα εδράζεται το ανοσοδραστικό τμήμα του πολυπεπτιδίου (42). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά ρητίνη με αμινοτελικώς προεκτεινόμενες αλληλουχίες κατά ένα αμινοξύ τη φορά, ξεκινώντας από το C-τελικό αμινοξύ 109 και φτάνοντας στο αμινοξύ 89. Τα πεπτίδια αυτά συγκρίθηκαν με το αυτούσιο πολυπεπτίδιο ως προς την ανοσοδραστικότητά τους -και συγκεκριμένα ως προς την ικανότητα ενίσχυσης της κυτταροτοξικότητας των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος καθώς και ως προς την ενίσχυση της αυτόλογης / μεικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης (autologous mixed lymphocyte reaction). Με βάση τα τους πειραματικά αποτελέσματα, οι ερευνητές ανέφεραν πως το ανοσοδραστικό τμήμα της ProTa «οριοθετείται» στο C-τελικό δεκαπεπτίδιο [100-109], με αλληλουχία TKKQKTDEDD. Το συμπέρασμα προέκυψε από την «ισάξια» ικανότητα του δεκαπεπτιδίου και του ακέραιου πολυπεπτιδίου να ενισχύουν την κυτταροτοξικότητα των μονοπύρηνων και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων.

Σε επόμενα πειράματα, το δεκαπεπτίδιο ελέγχθηκε από τους Samara και συνεργάτες ως προς την ικανότητά του να επιφέρει ενεργοποίηση ουδετερόφιλων κυττάρων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού και υγιείς δότες (43). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το δεκαπεπτίδιο ProTa[100-109] ενίσχυσε την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου από τα ουδετερόφιλα καθώς και την φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων κυττάρων ασθενών με καρκίνο του μαστού σε «ισάξια» επίπεδα με την ProTa.

1.3.4.2 Εξωκυτταρική δράση της ProTa: πιθανοί υποδοχείς

Ήδη από τη δεκαετία του 1990 ξεκίνησε συστηματική έρευνα για τον προσδιορισμό των υποδοχέων, μέσω των οποίων η ProTa ασκούσε την εξωκυτταρική της δράση. Σε μία από τις πρώτες σχετικές μελέτες, χρησιμοποιήθηκε ProTa μόσχου, που επισημάνθηκε με ραδιενεργό ιώδιο. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίστηκαν δύο πιθανά σημεία πρόσδεσης της ProTa, αλλά όχι της Τα1 (13), σε ανθρώπινα μονοκύτταρα κύτταρα αίματος. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν τρεις θέσεις δέσμευσης, μία υψηλής, μία χαμηλής και μία μέσης χημικής συγγένειας για την ProTa (44). Γενικά, θεωρήθηκε ότι οι υποδοχείς της ProTa απαντώνται σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης που είναι πλούσιες σε γλυκοσφιγγολιπίδια και χοληστερόλη (45).

Αργότερα, κατά τα τέλη της δεκαετίας 2000, μελέτες έθεσαν τα θεμέλια και τελικά παρουσίασαν την υπόθεση η ProTa να δρα μέσω του υποδοχέα TLR-4 (46,47). Περιληπτικά και με πολύ απλά λόγια, οι ερευνητές οδηγήθηκαν στην υπόθεση αυτή ως εξής: αρχικά μελέτησαν την επίδραση που έχει η επώαση μακροφάγων ποντικού με ProTa στις κυτταροκίνες που εκκρίνουν τα μακροφάγα. Το συμπέρασμα ήταν πως μακροφάγα που απομονώθηκαν από ποντικούς αγρίου τύπου, μετά από επώαση με ProTa, παρήγαγαν IFN- γ με ενεργοποίηση ενός TRIF-εξαρτώμενου μονοπατιού. Ακόμα, παρήγαγαν TNF- α , μέσω ενεργοποίησης ενός MyD88-εξαρτώμενου μονοπατιού. Και τα δύο αυτά μονοπάτια ενεργοποιούνται μέσω του υποδοχέα TLR-4.

Το 2013 οι Ιωαννου και συνεργάτες (48) διεξήγαγαν συγκριτική έρευνα μελετώντας τα λειτουργικά χαρακτηριστικά δενδριτικών κυττάρων, μετά από επώασή τους με ProTa και το C-τελικό δεκαπεπτίδιο του μορίου ProTa[100-109]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο η ProTa όσο και το δεκαπεπτίδιο επάγουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τα T-λεμφοκύτταρα. Μάλιστα, επιμέρους πειραματικά ευρήματα υποδηλώνουν ότι η ProTa και το δεκαπεπτίδιο πιθανόν να ασκούν τη δράση τους μέσω του υποδοχέα TLR-4. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε πρόσφατα από τα αποτελέσματα *in*

vitro μελετών των Karachaliou και συνεργατών (ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»). Σύμφωνα με αυτά, στην επιφάνεια ανθρώπινων ουδετερόφιλων βρίσκονται υποδοχείς που αναγνωρίζουν ειδικά και προσδένουν ^{99m}Tc-ραδιοεπισημασμένη μορφή του δεκαπεπτιδίου ProTa[100-109]. Η σύνδεση αυτή αναστέλλεται παρουσία του λιποπολυσακχαρίτη του μικροοργανισμού *Escherichia coli*, LPS, που θεωρείται ο πρότυπος προσδέτης του υποδοχέα TLR-4 (49).

Συμπερασματικά, τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα μπορούν μόνον να υποδείξουν κάποιους υποδοχείς για την ProTa σε συγκεκριμένα είδη κυττάρων. Επομένως, ανοίγεται ένα μεγάλο πεδίο έρευνας, με στόχο την πληρέστερη αποσαφήνιση του εξωκυτταρικού / διακυτταρικού τρόπου δράσης του πολυπεπτιδίου.

1.3.4.3 Εξωκυτταρική δράση της ProTa: πιθανές προοπτικές

Η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της ProTa και ακριβή ταυτοποίηση τόσο της ανοσοδραστικής της περιοχής, όσο και των υποδοχέων μέσω των οποίων δρά διακυτταρικά, γεννήθηκε από τις προοπτικές που δυνητικά προσφέρει η εξωκυτταρική της δράση. Η δράση αυτή ήταν η πρώτη που είχε αποδοθεί στο πολυπεπτίδιο μετά την απομόνωσή του, αμφισβητήθηκε για ένα διάστημα (όταν εντοπίστηκε στον κυτταρικό πυρήνα), σήμερα όμως είναι κοινώς αποδεκτή στη διεθνή βιβλιογραφία.

Από παλιότερες ήδη μελέτες, φάνηκε ότι η ProTa, χορηγούμενη εξωγενώς, ενισχύει την κυτταρομεσολαβητική ανοσία. Η παρατήρηση αυτή δεν προέκυψε μόνο από *in vitro* αλλά και από *in vivo* πειράματα. Πιο συγκεκριμένα, σε ποντικούς που τους χορηγούνταν καθημερινά ProTa, εκ παραλλήλου με διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε ψευδάργυρο, παρατηρήθηκε αύξηση των παραγόμενων αντισωμάτων έναντι ειδικού T-εξαρτώμενου αντιγόνου από κύτταρα του σπλήνα (50). Αποτελέσματα συναφών πειραμάτων σε νεαρούς ποντικούς έδειξαν πως χορήγηση συγκεκριμένης δόσης ProTa διπλασιάζει το λόγο των βοηθητικών CD4+ T-λεμφοκυττάρων προς τα κατασταλτικά CD8+ T-λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος. Επίσης, μετά από εξωγενή

χορήγηση ProTa, παρατηρήθηκε αύξηση του μεγέθους του θύμου αδένος (51). Άλλη μία παρατήρηση κατά τη χορήγηση ProTa σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς ήταν η επαγωγή έκκρισης του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων καθώς και η προστασία των συγκεκριμένων ποντικών από ευκαιριακές λοιμώξεις με *Candida albicans* (52). Η ProTa φέρεται ακόμα να αυξάνει την κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονικών κυττάρων NK (natural killers) (53) και των ενεργοποιημένων από λεμφοκίνες φονικών κυττάρων LAK (lymphokine-activated killers) (54). Ως προς την επίδραση της ProTa στα δενδριτικά κύτταρα, το πολυπεπτίδιο (καθώς και το C-τελικό δεκαπεπτίδιο του μορίου) φέρεται να επάγει *in vitro* την ωρίμανσή τους (55), όπως φαίνεται από την αύξηση των επιπέδων της επιφανειακής έκφρασης μορίων – δεικτών, π.χ. των HLA-DR, CD83, CD86, CD40, CD80 και CD11b. Μία πολλά υποσχόμενη εξωκυτταρική δράση της ProTa φαίνεται να είναι η πιθανή ανοσορρυθμιστική της ικανότητα στα αυτοάνοσα νοσήματα. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με παλιότερες μελέτες, στη σκλήρυνση κατά πλάκας η ProTa φέρεται να αποκαθιστά τα επίπεδα της μεικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης καθώς και την καλή λειτουργία των μονοπύρηνων κυττάρων *in vitro* (56), ενώ στον ερυθματώδη λύκο φέρεται να διεγείρει την έκφραση των μορίων MHC II. Ακόμη, η συγχορήγηση πλασμιδίου που εκφράζει ProTa φάνηκε να διεγείρει την ανοσολογική απόκριση τύπου I σε ζώα που εμβολιάστηκαν με DNA του ιού της ηπατίτιδας B (57). Τέλος, σε ασθενείς με καρκίνο, η ProTa βρέθηκε να αυξάνει την ενδοκυτταρική παραγωγή και εξωκυτταρική απελευθέρωση δραστικών ριζών οξυγόνου καθώς και την φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων του περιφερικού αίματος, ενισχύοντας τους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού (58).

1.3.5 Μελέτη της ProTa με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η πρωτοταγής δομή της ProTa παρουσιάζει μεγάλη συντήρηση μεταξύ των διάφορων ειδών θηλαστικών, επομένως πρόκειται για ένα πολυπεπτίδιο χαμηλής ανοσογονικότητας (59). Συνεπώς, η ανάπτυξη αντισωμάτων υψηλής χημικής συγγένειας και υψηλού τίτλου, έναντι του πολυπεπτιδίου, σε διάφορα είδη θηλαστικών φαίνεται να παρουσιάζει πρακτικές δυσκολίες. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι παρά το σχετικά υψηλό M.B. του (~12 kDa), το πολυπεπτίδιο οδηγεί σε ανάπτυξη αντισωμάτων μόνον όταν χορηγηθεί στο θηλαστικό – ξενιστή αφότου συζευχθεί σε ειδική πρωτεΐνη-φορέα, όπως, δηλαδή συμβαίνει και με τα μόρια μικρού M.B. (απτένια). Ο περιορισμός αυτός, σε ό,τι αφορά την ανάπτυξη αντισωμάτων, αντανakλάται και σε αντίστοιχα πρακτικά προβλήματα ως προς την ανάπτυξη εργαστηριακών ανοσοχημικών μεθόδων, με στόχο την ποιοτική ανίχνευση ή/και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ProTa σε βιολογικά δείγματα, που παρουσιάζουν ειδικό ενδιαφέρον.

Παρά τις δυσκολίες, ωστόσο, αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν μέχρι στιγμής κατορθώσει να αναπτύξουν αντισώματα έναντι της ProTa. Τα αντισώματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν, στη συνέχεια, για την ανάπτυξη ερευνητικών ανοσοχημικών μεθόδων (π.χ. μεθόδων ELISA, μεθόδων ραδιοανοσοανάλυσης (RIA), μεθόδων ανοσοϊστοχημείας, κ.λπ.), οι οποίες εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση της ProTa σε βιολογικά δείγματα ειδικού ενδιαφέροντος (Πίνακας 1.2). Μικρός αριθμός αντισωμάτων, καθώς και ορισμένες τυποποιημένες συσκευασίες ELISA για την ProTa, κυκλοφορούν σήμερα στο εμπόριο. Ωστόσο, οι περισσότεροι ερευνητές, που ασχολούνται με τη μελέτη του πολυπεπτιδίου, χρησιμοποιούν κυρίως αντισώματα που έχουν αναπτύξει και αξιολογήσει οι ίδιοι στο εργαστήριό τους.

Πίνακας 1.2. Ενδεικτικός πίνακας ερευνητικών μελετών που βασίστηκαν στη χρήση αντισωμάτων - ανοσοχημικών μεθόδων για την ProTa.

Είδος δείγματος	Ανοσοχημική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε	Βιβλιογραφική παραπομπή
Δείγμα ούρων υγιών δοτών, ασθενών με λοίμωξη του ουροποιητικού, ασθενών με μεταστατικό και μη-μεταστατικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης	ELISA	Tzai <i>et al.</i> , 2006 (60)
Πλάσμα αίματος ασθενών με καρκίνωμα ουροθηλιακών και νεφρικών κυττάρων	ELISA	Zou <i>et al.</i> , 2013 (61)
Οροί αίματος υγιών δοτών και ασθενών καρκίνου του μαστού Εκχυλίσματα ιστού ασθενών με καρκίνο του μαστού	ELISA	Costopoulou <i>et al.</i> , 1998 (62)
Οροί αίματος ποντικών μολυσμένων με το βακτήριο <i>Streptococcus pyogenes</i>	ELISA	Samara <i>et al.</i> , 2013 (63)
Εκχύλισμα ιστού μαστού ασθενών με καρκίνο του μαστού	RIA	Tsitsiloni <i>et al.</i> , 1994 (64)
Τομές ιστού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη	Ανοσοϊστοχημεία	Klimetzou <i>et al.</i> , 2008 (65)
Καρκινικές κυτταρικές σειρές	Ανοσοκυτταρολογία	

Μερικές πληροφορίες ως προς τα αντισώματα και το ανοσοποιητικό σύστημα, εν γένει, θα δώσουμε στο επόμενο κεφάλαιο.

2.1 Το Ανοσοποιητικό σύστημα

Το Ανοσοποιητικό σύστημα (γενική βιβλιογραφία: Goldsby *et al.*, 2007) αναπτύχθηκε για να προστατεύει πολυκύτταρους οργανισμούς από παθογόνα. Είναι ένα υψηλά ευπροσάρμοστο αμυντικό σύστημα και προστατεύει το σώμα από ποικίλους εισβολείς. Διαθέτει τεράστια ποικιλία κυττάρων και μορίων, ικανών για την ειδική αναγνώριση και εξουδετέρωση ποικιλίας ξένων εισβολέων. Η προστασία που παρέχει το ανοσοποιητικό σύστημα οφείλεται σε δύο, κυρίως, δραστηριότητες: την αναγνώριση και την απόκριση. Τυπικά, η αναγνώριση ενός παθογόνου από το ανοσοποιητικό σύστημα πυροδοτεί μια δραστική απόκριση, η οποία περιορίζει ή εξουδετερώνει τον εισβολέα. Το ανοσοποιητικό έχει την ικανότητα να διακρίνει τα εαυτά συστατικά του από τα ξένα. Η απόκριση έγκειται στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (και των λοιπών παραγόντων του ανοσοποιητικού) προς εξάλειψη του αντιγόνου.

2.1.1 Έμφυτη και ειδική ανοσία

Υπάρχουν δύο είδη ανοσίας, η έμφυτη και η ειδική. Η έμφυτη ανοσία συγκροτείται από όλους τους αμυντικούς μηχανισμούς που αναπτύσσονται έναντι μιας μόλυνσης και είναι έτοιμοι προς άμεση ενεργοποίηση πριν ακόμα εκδηλωθεί η επίθεση από ένα παθογόνο. Το σύστημα της έμφυτης ανοσίας περιλαμβάνει φυσικούς, χημικούς, και κυτταρικούς φραγμούς. Οι κύριοι φυσικοί φραγμοί είναι το δέρμα και οι βλεννογόνοι. Οι χημικοί φραγμοί περιλαμβάνουν την οξύτητα του περιεχομένου του στομάχου και εξειδικευμένα διαλυτά μόρια με αντιμικροβιακή δραστικότητα. Η κυτταρική αμυντική γραμμή της έμφυτης ανοσίας αποτελείται από σειρά κυττάρων με ευαίσθητους υποδοχείς που ανιχνεύουν μικροβιακά προϊόντα και προκαλούν την αντεπίθεση του οργανισμού. Η έμφυτη ανοσία ενεργοποιεί το συμπλήρωμα, που αποτελείται από σειρά διαλυτών παραγόντων του αίματος. Πιο αναλυτικά, στην έμφυτη ανοσία συγκαταλέγονται οι

επιθηλιακοί φραγμοί και ο φραγμός του δέρματος, τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα φαγοκύτταρα, που διακρίνονται σε ουδετερόφιλα και σε μονοκύτταρα (τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε μακροφάγα), καθώς και διάφορα μόρια - διαβιβαστές, όπως οι κυτταροκίνες, που εκκρίνονται από συγκεκριμένα είδη κυττάρων ως απόκριση στην παρουσία εισβολέων και επάγουν συγκεκριμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράδειγμα κυτταροκινών είναι οι ιντερλευκίνες (ILs), οι οποίες εκκρίνονται από τα μακροφάγα της έμφυτης ανοσίας, αλλά και τα βοηθητικά CD4+ T_H κύτταρα της ειδικής ανοσίας. Στις κυτταροκίνες συγκαταλέγονται επίσης οι ιντερφερόνες (IFNs). Οι ιντερφερόνες απελευθερώνονται αποκρινόμενες στην παρουσία ιών. Αναστέλλουν την αντιγραφή του ιού μέσα στο κύτταρο - ξενιστή και, ακόμα, επάγουν την απόπτωση του μολυσμένου κυττάρου. Οι παράγοντες νέκρωσης όγκων, TNFs, συμπεριλαμβάνονται επίσης στις κυτταροκίνες. Οι TNFs παράγονται από μεγάλη ποικιλία κυττάρων, όπως μακροφάγα, ενδοθηλιακά, ινοβλάστες, νευρικά κύτταρα, σιτευτικά και καρδιομυοκύτταρα.

Αν η έμφυτη ανοσία δεν καταστρέψει το αντιγόνο-εισβολέα στην περίπτωση που αυτό καταφέρει να εισέλθει στον οργανισμό, ενεργοποιείται η ειδική ανοσία. Ενεργοποιούνται τα Β-λεμφοκύτταρα από τα οποία και παράγονται ειδικά αντισώματα για συγκεκριμένα αντιγόνα. Ακόμη, ενεργοποιούνται τα Τ-λεμφοκύτταρα.

Τα Τ-λεμφοκύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών, αλλά ωριμάζουν στο θύμο αδένα. Ωριμάζοντας, εκφράζουν στην επιφάνειά τους εξειδικευμένους υποδοχείς, μέσω των οποίων και αναγνωρίζουν τα αντιγόνα που συνδέονται με τις πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC, οι οποίες και λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια. Οι πρωτεΐνες MHC διακρίνονται σε τάξης I και II. Οι MHC τάξης I βρίσκονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα και αλληλεπιδρούν με τα κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα, T_C. Οι MHC τάξης II βρίσκονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και αλληλεπιδρούν με τα βοηθητικά Τ-κύτταρα, T_H, διεγείροντας την έκκριση κυτταροκινών, που ενεργοποιούν τα Β-κύτταρα και ενισχύουν, με αυτό τον τρόπο, την ανοσολογική απόκριση.

Τα Β-λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στο μυελό των οστών, τον οποίο στη συνέχεια εγκαταλείπουν. Ωριμα πλέον εμφανίζουν στην επιφάνειά τους εξειδικευμένο υποδοχέα για έναν συγκεκριμένο επίτοπο, δηλαδή τη συγκεκριμένη περιοχή στο μόριο του ξένου αντιγόνου, πανομοιότυπο με το αντίσωμα που θα εκκρίνουν εν συνεχεία. Η πρόσδεση του αντιγόνου στον υποδοχέα επάγει τον πολλαπλασιασμό των Β – λεμφοκυττάρων και τον μεταγενέστερο μετασχηματισμό τους σε κύτταρα μνήμης, τα οποία ενεργοποιούνται αμέσως σε πιθανή μετέπειτα επαφή με το ίδιο αντιγόνο, καθώς και σε πλασματοκύτταρα, τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες αντισώματος στο κυκλοφορικό σύστημα.

2.2 Αντιγόνα

Ως αντιγόνα (antigens) ορίζονται ειδικά τα μόρια που αλληλεπιδρούν με τον ανοσοσφαιρινικό υποδοχέα των Β - κυττάρων, ή και με τον υποδοχέα των Τ – κυττάρων όταν συνδυάζονται με τα μόρια ΜΗC. Γενικότερα, αντιγόνο, ή ακριβέστερα ανοσογόνο, είναι κάθε συστατικό που επάγει χυμική ή /και κυτταρομεσολαβητική ανοσολογική απόκριση. Η ικανότητα αυτή ονομάζεται ανοσογονικότητα. Από την άλλη πλευρά, αντιγονικότητα είναι η ικανότητα ενός μορίου να συνδέεται ειδικά με τα τελικά προϊόντα των παραπάνω αποκρίσεων, δηλαδή με τα εκκρινόμενα αντισώματα και τους επιφανειακούς Τ - κυτταρικούς υποδοχείς. Τα μόρια που διαθέτουν ανοσογονικότητα, διαθέτουν επίσης αντιγονικότητα, το αντίστροφο, όμως, δεν ισχύει πάντοτε. Για παράδειγμα, τα μικρού μοριακού βάρους «ξένα» μόρια, γνωστά και ως απτένια, αποτελούν αντιγονικά μόρια, δεν είναι ωστόσο ικανά να προκαλέσουν από μόνα τους ανοσολογική απόκριση. Για να καταστούν ανοσογονικά απαιτείται η ομοιοπολική σύζευξή τους με κατάλληλο φορέα, όπως είναι κάποιες πρωτεΐνες υψηλού Μ.Β. (πρωτεΐνες – φορείς).

2.3 Αντισώματα

Τα αντισώματα (antibodies), ή ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins), όπως και οι υποδοχείς των Τ-κυττάρων, αποτελούν τα κομβικά μόρια του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, ή αλλιώς της ειδικής ανοσίας. Κατά μία έννοια, τα αντισώματα λειτουργούν ως τα εκτελεστικά όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, τα αντισώματα, που παράγονται από τα Β- λεμφοκύτταρα, αναγνωρίζουν ειδικούς αντιγονικούς καθοριστές (επιτόπους) στο μόριο του ξένου αντιγόνου - εισβολέα, με τους οποίους και συνδέονται μέσω των, μοναδικής εξειδίκευσης, παρατόπων τους, δηλαδή την περιοχή του αντισώματος που αναγνωρίζει τον αντίστοιχο επίτοπο στο μόριο του αντιγόνου. Η σύνδεση παρατόπου – επιτόπου γίνεται με την ακρίβεια κλειδιού – κλειδαριάς. Η σύνδεση αυτή αποτελεί το έναυσμα σειράς διεργασιών που ως στόχο έχουν την απομάκρυνση του ξένου εισβολέα από τον οργανισμό.

Όλα τα αντισώματα περιλαμβάνουν μια κοινή δομή τεσσάρων πεπτιδικών αλυσίδων. Η δομή αυτή αποτελείται από δύο πανομοιότυπες μεταξύ τους, σχετικά μικρότερες (ελαφριές), πολυπεπτιδικές αλυσίδες και δύο πανομοιότυπες, σχετικά μεγαλύτερες (βαριές) αλυσίδες. Κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με μία βαριά με έναν δισουλφιδικό δεσμό και μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι δύο βαριές αλυσίδες συνδέονται επίσης μεταξύ τους με μη ομοιοπολικούς και με δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα αντισώματα περιέχουν την μεταβλητή V (variable) και τη σταθερή C (constant) περιοχή. Στην μεταβλητή περιοχή οφείλεται η εξειδίκευση του κάθε αντισώματος έναντι συγκεκριμένου επιτόπου. Η μεταβλητότητα της περιοχής αυτής οφείλεται στην αντίστοιχη μεταβλητότητα / υψηλή ποικιλομορφία της αμινοτελικής αμινοξικής αλληλουχίας μιας βαριάς και μίας ελαφριάς αλυσίδας. Τμήματα της μεταβλητής περιοχής μιας βαριάς και μιας ελαφριάς αλυσίδας συνδέονται μεταξύ τους, με μη ομοιοπολικούς δεσμούς, και οδηγούν στο σχηματισμό του παρατόπου. Κάθε βασική δομή αντισώματος, αποτελούμενη από δύο βαριές και δύο ελαφριές αλυσίδες, περιέχει δύο, ταυτόσημους μεταξύ τους, παρατόπους.

Τα αντισώματα των θηλαστικών ανήκουν σε πέντε διαφορετικές τάξεις, τις IgM, IgG, IgA, IgD και IgE. Τα αντισώματα, που κυκλοφορούν στο αίμα των θηλαστικών και είναι δυνατόν να απομονωθούν από τον αντιγόνο ανοσοποιημένων ζώων μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση στο αντιγόνο (αντισώματα δεύτερης ανοσολογικής απόκρισης), ανήκουν κατά κύριο λόγο στην τάξη IgG.

2.3.1 Αντισώματα Υ

Τα αντισώματα Υ (γενική βιβλιογραφία: Schade et al., 2001 – Κλημέντζου, 2002 – Härtle et al., 2014) (66) είναι μία κατηγορία αντισωμάτων που αποτελούν την κύρια τάξη ανοσοσφαιρινών των πτηνών, και μάλιστα είναι ανάλογα των αντισωμάτων IgG των θηλαστικών. Είναι αντισώματα που συμμετέχουν στη δεύτερη ανοσολογική απόκριση, δηλαδή στην απόκριση του οργανισμού σε ένα αντιγόνο στο οποίο ο οργανισμός έχει εκτεθεί ξανά κατά το παρελθόν. Στα πτηνά τα αντισώματα Υ μεταφέρονται εκλεκτικά και σε μεγάλες ποσότητες από την κυκλοφορία του αίματος στον κρόκο του αυγού μέσω ειδικών υποδοχέων. Ο λόγος της παρουσίας τόσο μεγάλων ποσοτήτων αντισωμάτων Υ στον κρόκο είναι η ενίσχυση της προστασίας του εμβρύου.

Στα μέσα της δεκαετίας του 2000, ερευνητές του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» ανέπτυξαν για πρώτη φορά αντισώματα IgY έναντι της ProTa. Η ιδέα για την ανάπτυξη αντισωμάτων IgY έναντι της ProTa, με στόχο την εφαρμογή τους στην περαιτέρω μελέτη του πολυπεπτιδίου, οφείλεται σε κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα που τα αντισώματα αυτά παρουσιάζουν έναντι της χρήσης αντισωμάτων των θηλαστικών, όπως τα IgG. Γενικότερα, η ανοσοποίηση ορνίθων έναντι θηλαστικών παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

1. Τα πτηνά μπορούν δυνητικά να αναπτύξουν καλύτερα αντισώματα έναντι πρωτεϊνών των θηλαστικών, λόγω της φυλογενετικής απόστασης μεταξύ των δύο ειδών οργανισμών. Θεωρητικά, όσο αυξάνει η φυλογενετική απόσταση ανάμεσα στο είδος από το οποίο προέρχεται το αντιγόνο και το είδος του ανοσοποιημένου ζώου, τόσο αυξάνει κι η ανοσολογική απόκριση του τελευταίου. Η φυλογενετική διαφορά ανάμεσα στα πτηνά και τα θηλαστικά είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τη φυλογενετική απόσταση μεταξύ δύο ειδών θηλαστικών. Επομένως, είναι προτιμότερη η ανοσοποίηση ορνίθων για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι αντιγόνου που προέρχεται από άνθρωπο ή άλλο είδος θηλαστικού –ιδιαίτερα εάν η δομή του αντιγόνου αυτού είναι υψηλά συντηρημένη μεταξύ των θηλαστικών.

2. Εκτός από τον ορό του αίματος, ο κρόκος του αυγού των ανοσοποιημένων πτηνών αποτελεί πλούσια πηγή αντισωμάτων, επειδή μητρικά αντισώματα μεταφέρονται από τον ορό στον κρόκο του αυγού για προστασία του εμβρύου, όπως ήδη αναφέρθηκε. Η ενεργή μεταφορά των ανοσοσφαιρινών Υ από τον ορό του αίματος στον κρόκο του αυγού οδηγεί σε συγκεντρώσεις τουλάχιστον συγκρίσιμες με εκείνες του ορού. Συνεπώς, όπως αναφέρει η βιβλιογραφία, η ποσότητα των ανοσοσφαιρινών Υ, που μπορούν να παραληφθούν σε έναν μήνα, είναι > 10 φορές υψηλότερη από την ποσότητα IgG που μπορεί να παραληφθεί από τον ορό αίματος ενός κουνελιού.

3. Η απομόνωση των ανοσοσφαιρινών Υ γίνεται από τον κρόκο του αυγού –όχι από τον ορό του αίματος. Η συλλογή των αυγών έναντι της αιμοληψίας και της παραλαβής αντιορού, είναι διαδικασία λιγότερο επώδυνη για το ζώο, ενώ επίσης δεν απαιτεί ιδιαίτερα εξειδικευμένο προσωπικό.

4. Ο κρόκος του αυγού περιέχει αντισώματα που ανήκουν σχεδόν αποκλειστικά στις ανοσοσφαιρίνες Υ. Έτσι, κατά το διαχωρισμό του κλάσματος των ανοσοσφαιρινών από τον κρόκο του αυγού παραλαμβάνονται ανοσοσφαιρίνες Υ, με πολύ υψηλή

καθαρότητα και απόδοση, χωρίς προσμίξεις ανοσοσφαιρινών Α και Μ.

5. Οι ανοσοσφαιρίνες Υ, εν αντιθέσει με τις ανοσοσφαιρίνες G, δεν αντιδρούν με ρευματοειδείς παράγοντες ή Fc υποδοχείς των θηλαστικών. Συνεπώς, η χρήση ανοσοσφαιρινών Υ έναντι των ανοσοσφαιρινών G στην ανάπτυξη *in vitro* ανοσοχημικών μεθόδων, π.χ. μεθόδων ανοσοανάλυσης, θεωρητικά ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο λήψης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

6. Οι ανοσοσφαιρίνες Υ είναι περισσότερο θέρμο- και οξεο-άντοχες σε σχέση με τις ανοσοσφαιρίνες G των θηλαστικών. Επομένως, υπάρχει η πιθανότητα, έστω θεωρητικά, να χορηγηθούν *per os* για την πρόληψη ή τη θεραπεία μολυσματικών παθήσεων του γαστρεντερικού σε νεαρά ζώα.

2.3.2 Ορισμοί - Χαρακτηριστικά Αντισωμάτων

Τίτλος (Titer): Με τον όρο τίτλος χαρακτηρίζουμε τη σχετική συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων που περιέχονται σε δείγμα αντιορού ή σε άλλο παρασκεύασμα που περιέχει αντισώματα. Προς προσδιορισμό του τίτλου ενός παρασκευάσματος, που περιέχει αντισώματα, πραγματοποιούνται τα ομώνυμα πειράματα, δηλαδή πειράματα τιτλοδότησης, συνήθως με μέθοδο ELISA. Κατά παραδοχή, ο τίτλος ενός αντισώματος είναι η αραίωση του αντίστοιχου αντιορού (ή η ενδεικτική συγκέντρωση του παρασκευάσματος που περιέχει το υπό τιτλοδότηση αντίσωμα) που αντιστοιχεί σε τιμή οπτικής απορρόφησης (A) ~1.0.

Χημική συγγένεια (Affinity): Ο όρος εκφράζει την ισχύ με την οποία συνδέεται ο παράτοπος του αντισώματος με τον επίτοπο του αντιγόνου.

Εξειδίκευση (Specificity): Ο όρος εκφράζει την ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει αποκλειστικά και μόνο το αντίστοιχο αντιγόνο.

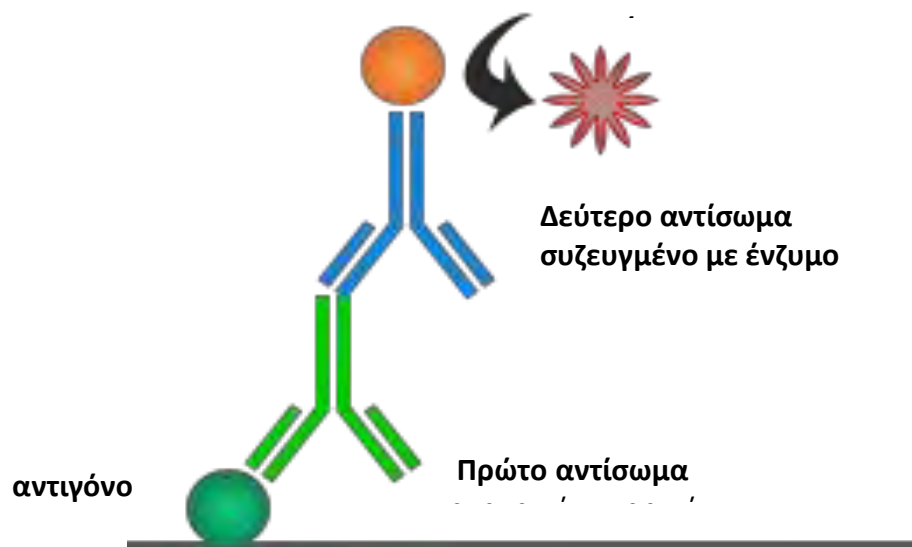
2.3.3 Τιτλοδότηση αντισωμάτων με μέθοδο ELISA

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αξιολόγηση του τίτλου των αντισωμάτων γίνεται, στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, με μια συγκεκριμένη μορφή της μεθόδου ELISA (γενική βιβλιογραφία: Deshpande, 1996). Η γενική αρχή της μεθόδου δημοσιεύτηκε το 1971 από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, των Peter Perlmann και Eva Engvall και των Anton Schuurs και Bauke van Weemen (67,68). Διάφορες μορφές της μεθόδου (π.χ. ανταγωνιστική ELISA ή μη ανταγωνιστική (sandwich) ELISA) χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την ποιοτική ανίχνευση ή/και τον ποσοτικό προσδιορισμό πλήθους αντιγόνων σε ειδικά δείγματα. Οι μορφές αυτές είναι πιο πολύπλοκες από τη μέθοδο τιτλοδότησης αντισωμάτων σε δείγμα αντιορού, ή σε άλλο παρασκεύασμα που περιέχει αντισώματα. Η μέθοδος τιτλοδότησης αντισωμάτων, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Σχήμα 2.1), περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

Για τον προσδιορισμό της σχετικής συγκέντρωσης ειδικού αντισώματος σε δείγμα αντιορού, ή σε άλλο παρασκεύασμα που περιέχει αντισώματα πραγματοποιούνται πειράματα τιτλοδότησης κατά την ακόλουθη διαδικασία (Σχήμα 2.1):

Αρχικά, πραγματοποιείται ακινητοποίηση (immobilization) του αντίστοιχου αντιγόνου, συνήθως μέσω μη ομοιοπολικής προσρόφησης, στην επιφάνεια των φρεατίων πλακιδίου ELISA (Σχήμα 2.2). Τα πλακίδια αυτά διαθέτουν 96 διακριτές κοιλότητες (=φρεάτια) και είναι κατασκευασμένα από πολυστυρόλιο, που συνήθως έχει υποστεί ειδική προεπεξεργασία. Εν συνεχεία, πραγματοποιούνται εκπλύσεις των πλακιδίων, ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του αντιγόνου που δεν προσροφήθηκε στα φρεάτια. Ακολουθεί κορεσμός (blocking) των κενών θέσεων στην επιφάνεια των φρεατίων, που πιθανόν δεν καλύφθηκαν από μόρια του αντιγόνου, με ειδικό διάλυμα (συνήθως διάλυμα πρωτεΐνης, όπως η βόειος οραλβουμίνη – BSA). Μετέπειτα, προστίθεται και επωάζεται σε διαδοχικές αραιώσεις το υπό αξιολόγηση αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα). Μετά από κατάλληλο χρονικό διάστημα, τα φρεάτια εκπλένονται, ώστε να απομακρυνθεί ό,τι δεν έχει αντιδράσει με το

ακίνητοποιημένο αντιγόνο, και επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα, που αναγνωρίζει ειδικά το πρώτο και που έχει νωρίτερα συνδεθεί με ένα ένζυμο – ιχνηθέτη (δεύτερο αντίσωμα επισημασμένο με ένζυμο). Μετά από κατάλληλο χρονικό διάστημα, τα φρεάτια εκπλένονται και πάλι, ώστε να απομακρυνθούν όσα μόρια δεύτερου αντισώματος δεν έχουν αντιδράσει με το πρώτο αντίσωμα, και ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλου, χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος στα φρεάτια. Παρουσία του ενζύμου, το υπόστρωμα μετατρέπεται σε έγχρωμο προϊόν. Η οπτική απορρόφηση (A) του έγχρωμου προϊόντος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του πρώτου αντισώματος στο υπό μελέτη παρασκεύασμα. Ο τίτλος ενός αντισώματος σε αντιορό είναι η αραίωση εκείνη του αντιορού που αντιστοιχεί σε τιμή οπτικής απορρόφησης ~ 1.0 . Αντίστοιχα, ο τίτλος ενός αντισώματος που περιέχεται σε άλλου είδους παρασκεύασμα (π.χ. εμπλουτισμένο παρασκεύασμα κρόκου αυγών από ανοσοποιημένα πτηνά) είναι η ενδεικτική συγκέντρωση του παρασκευάσματος που αντιστοιχεί σε τιμή οπτικής απορρόφησης ~ 1.0 .



Σχήμα 2.1. Παραστατική απεικόνιση της μεθόδου ELISA, στην οποία βασίζεται η τιτλοδότηση των αντισωμάτων



Σχήμα 2.2. Πλακίδιο ELISA των 96 φρεατίων

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την αξιολόγηση αντισωμάτων Υ έναντι της ProΤα, σε ειδικά παρασκευάσματα κρόκου αυγών από ανοσοποιημένα πτηνά. Τα αντισώματα Υ, αναπτύχθηκαν κατά το παρελθόν στα εργαστήρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» (69), με ανοσοποίηση πτηνών (όρνιθες ωοτοκίας). Τα υπό αξιολόγηση αντισώματα είχαν αναπτυχθεί έναντι ολόκληρου του πολυπεπτιδίου (είτε συζευγμένου ή μη-συζευγμένου στην πρωτεΐνη-φορέα keyhole limpet hemocyanin – KLH), ή έναντι συνθετικών πεπτιδικών τμημάτων του πολυπεπτιδίου, συζευγμένων στην KLH. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν τα εξής αντισώματα Υ:

- 1. anti-ProΤα[1-28]/KLH ή anti-Τα1/KLH (κωδικός IgY1)
- 2. anti-ProΤα (κωδικός IgY2)
- 3. anti-ProΤα/KLH (κωδικός IgY3)
- 4. anti-ProΤα[100-109]/KLH (κωδικός IgY4)

Η αξιολόγηση των παραπάνω αντισωμάτων έγινε μέσω πειραμάτων τιτλοδότησης με μέθοδο ELISA. Τα αντισώματα Υ με τον βέλτιστο τίτλο θα μπορούσαν να αξιολογηθούν περαιτέρω και εν δυνάμει να χρησιμοποιηθούν στον ευαίσθητο ποιοτικό ή/και ποσοτικό προσδιορισμό του μορίου σε βιολογικά δείγματα, με στόχο την καλύτερη μελέτη του πολυπεπτιδίου και την καλύτερη δυνατή αξιοποίηση των πιθανών διαγνωστικών ή/και θεραπευτικών ιδιοτήτων του.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ELISA

3.1 Όργανα και υλικά

- Φωτόμετρο πλακιδίων ELISA, Model Sirio S (Seac)
- Επωαστικός κλίβανος Precision, 4EG
- Συσκευή αυτόματης έκπλυσης πλακών ELISA, DIA Source
- Πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA: Costar 3590
- Bovine Serum Albumin (BSA): albumin bovine for Biochemistry, Fraction V, ACROS ORGANICS
- IgY εμπορίου, «μη ειδική» IgY: Sigma (I-4881)1.ProTa: απομονωμένη από βόειο ιστό, Thymoorgan
- ProTa: απομονωμένη από βόειο ιστό, Thymoorgan
- ProTa[1-28] (Ta1):συνθετική, παρασκευασμένη στο εργαστήριο, σύμφωνα με μεθοδολογία της βιβλιογραφίας (70,71), κατάλληλα τροποποιημένη
- Rabbit anti-chicken IgY / HRP: Sigma (A-9046) [Πρόκειται για δεύτερο αντίσωμα, ανεπτυγμένο σε κουνέλια εναντίον ανοσοσφαιρίνης Y από όρνιθες ωοτοκίας, και επισημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP)].
- Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,01 M, pH 5,0 (CB)
Κιτρικό οξύ 0,431 g
Κιτρικό νάτριο 0,85 g

Τα στερεά συστατικά διαλύονται σε 80 ml δισ-απεσταγμένο H₂O (d-H₂O). Αν το pH είναι < 5,0, ρυθμίζεται σε 5,0 με διάλυμα NaOH. Αν το pH είναι >5,0, ρυθμίζεται σε 5,0 με διάλυμα κιτρικού οξέος. Έπειτα, ο όγκος συμπληρώνεται σε 100 ml με d-H₂O.

- Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών – χλωριούχων 0,01 M, pH 7,4 (PBS)

KH₂PO₄ 0,204 g

Na₂HPO₄ 1,424 g

KCl 0,201 g

NaCl 8,766 g

Τα συστατικά διαλύονται σε 800 ml d-H₂O. Αν χρειαστεί, ακολουθεί ρύθμιση του pH σε 7,4. Έπειτα, συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι 1 l με d-H₂O.

- Διάλυμα έκπλυσης: 0,05 %, v/v, Tween-20 σε PBS
- Διάλυμα κορεσμού: διάλυμα έκπλυσης με 2 %, w/v, αποβουτυρωμένο γάλα εμπορίου σε σκόνη (Regilait)
- Διάλυμα αραίωσης: διάλυμα έκπλυσης με 0,2 %, w/v, BSA
- Διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος

Na₂HPO₄ 2H₂O 8,900 g

Κιτρικό οξύ 10,537 g

Υπερβορικό νάτριο 0,241 g

Τα στερεά συστατικά διαλύονται σε 400 ml d-H₂O και το pH ρυθμίζεται σε 4,4 με διάλυμα NaOH. Ο όγκος συμπληρώνεται έως 500 ml με H₂O.

Στη συνέχεια, προστίθενται 0,5 g ABTS [(2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) και το διάλυμα αναδεύεται έως την πλήρη διάλυση του ABTS.

3.2 Αντισώματα

Αξιολογήθηκαν τα εξής αντισώματα Υ:

- 1. anti-Tα1/KLH (κωδικός: IgY1)
Τα αντισώματα αυτά αναπτύχθηκαν έναντι του συνθετικού N-τελικού 28-πεπτιδίου της ProTα (ProTα[1-28] ή Tα1), αφού είχε προηγηθεί σύζευξή του στην πρωτεΐνη-φορέα KLH.
- 2. anti-ProTα (κωδικός: IgY2)
Τα αντισώματα αυτά αναπτύχθηκαν έναντι του ακέραιου πολυπεπτιδίου ProTα, σε μη-συζευγμένη μορφή.
- 3. anti-ProTα/KLH (κωδικός: IgY3)
Τα αντισώματα αυτά αναπτύχθηκαν έναντι του ακέραιου πολυπεπτιδίου ProTα αφού είχε προηγηθεί σύζευξή του με την πρωτεΐνη-φορέα KLH.
- 4. anti-ProTα[100-109]/KLH (κωδικός: IgY4)
Τα αντισώματα αυτά αναπτύχθηκαν έναντι του συνθετικού τελικού C-τελικού δεκαπεπτιδίου της ProTα (ProTα[100-109]), αφού είχε προηγηθεί σύζευξή του στην πρωτεΐνη-φορέα KLH.

Τα αντισώματα Υ περιέχονταν σε εμπλουτισμένα παρασκευάσματα, που προέκυψαν μετά από καθαρισμό του κλάσματος των ανοσοσφαιρινών από τον κρόκο του αυγού ανοσοποιημένων πτηνών. Η μεθοδολογία καθαρισμού περιγράφεται αναλυτικά σε δημοσιεύσεις, τόσο των ομάδων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» όσο και άλλων ερευνητών (γενική βιβλιογραφία: Schade *et al.*, 2001 – Κλημέντζου, 2002) (69).

3.3 Πειραματικό πρωτόκολλο

3.3.1 Πρωτόκολλο I

Πραγματοποιείται επίστρωση των φρεατίων ELISA με διάλυμα ProTa (0,1 $\mu\text{g/ml}$ σε CB, 100 μl /φρεάτιο). Τα πλακίδια παραμένουν όλη νύχτα (περίπου 18 ώρες) στους 4° C. Την επομένη το διάλυμα αποχύνεται και ακολούθως τα φρεάτια εκπλένονται 2 φορές με διάλυμα PBS. Στη συνέχεια, γίνεται επώαση με διάλυμα κορεσμού (200 μl /φρεάτιο) για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό έχει ως στόχο την κάλυψη τυχόν κενών θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων. Το διάλυμα αποχύνεται και τα φρεάτια εκπλένονται με διάλυμα έκπλυσης 3 φορές στο μηχάνημα αυτόματης έκπλυσης πλακιδίων ELISA. Ακολούθως, προστίθενται τα εμπλουτισμένα παρασκευάσματα των αντισωμάτων (IgY1, IgY2, IgY3 ή IgY4) στα φρεάτια (100 μl /φρεάτιο), σε διαδοχικά μειούμενες συγκεντρώσεις (100, 50, 20, 10, 5 $\mu\text{g/ml}$), και παραμένουν για 2 ώρες στους 37° C. Ακολουθεί απόχυση και έκπλυση των φρεατίων με διάλυμα έκπλυσης 3 φορές. Τα φρεάτια επωάζονται εν συνεχεία με το ενζυμικά επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα, σε αραιώση 1:2000 (100 μl /φρεάτιο) για 1,5 ώρα στους 37° C. Το διάλυμα αποχύνεται, ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα έκπλυσης 3 φορές και επώαση των φρεατίων με το διάλυμα του ενζυμικού υποστρώματος (100 μl /φρεάτιο) για 30 λεπτά στους 37° C. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm στο φωτόμετρο.

3.3.2 Πρωτόκολλο II

Το πρωτόκολλο II είναι, στην ουσία, όμοιο με το πρωτόκολλο I. Η μόνη διαφορά είναι ότι η αρχική επίστρωση των φρεατίων γίνεται με διάλυμα Τα1 (0,1 $\mu\text{g/ml}$ σε CB, 100 $\mu\text{l/φρεάτιο}$), ενώ τα πλακίδια παραμένουν όλη νύχτα (περίπου 18 ώρες) στους 37° C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

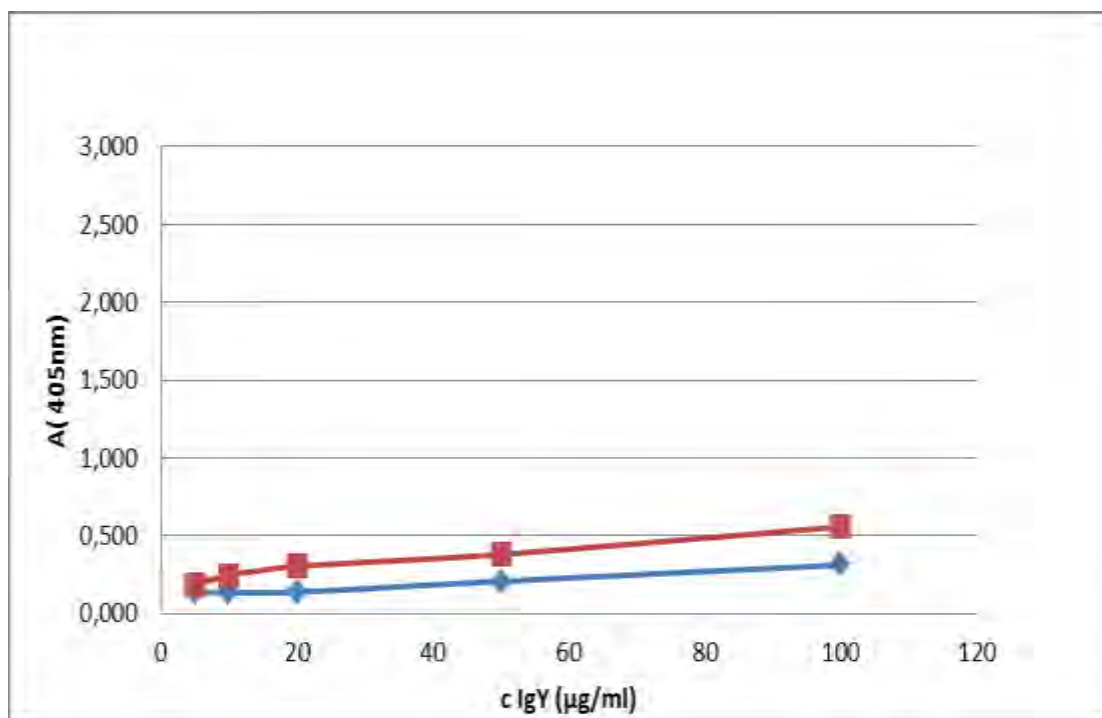
4.1. Αποτελέσματα πειραμάτων τιτλοδότησης ELISA

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων τιτλοδότησης των IgY1, IgY2, IgY3 και IgY4 ως προς ProTa παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.1, 4.3, 4.5 και 4.7, αντίστοιχα. Επικουρικά, παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα των πειραμάτων τιτλοδότησης των IgY1, IgY2, IgY3 και IgY4 ως προς Τα1, στα Σχήματα 4.2, 4.4, 4.6 και 4.8, αντίστοιχα. Στο πλαίσιο της αξιολόγησης, χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμη ανοσοσφαιρίνη Υ («μη-ειδική IgY») ως αρνητικός μάρτυρας.

Στα Σχήματα 4.1 έως 4.8 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα ενός ενδεικτικού πειράματος, από συνολικά τρία διαδοχικά πειράματα τιτλοδότησης. Κάθε πειραματικό σημείο αντιστοιχεί στο μέσο όρο έξι συνολικά φρεατίων.

Συγκριτικά, οι καμπύλες τιτλοδότησης των IgY1, IgY2, IgY3 και IgY4 ως προς ProTa παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.9.

4.1.1 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι Τα1/KLH (επίστρωση φρεατίων με διάλυμα ProTa 0,1 µg/ml)

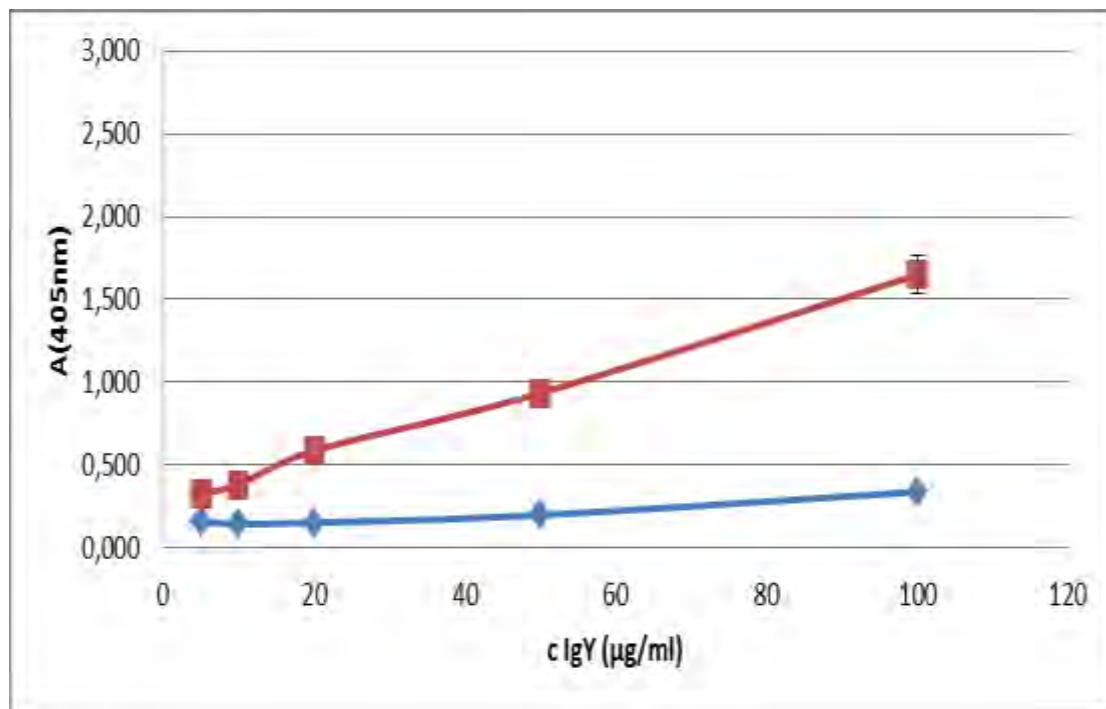


Σχήμα 4.1. Καμπύλη τιτλοδότησης ELISA των αντισωμάτων Υ με κωδικό IgY1 (□), ως προς ProTa. «Μη-άνοση» IgY (◇) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις IgY1, οι τιμές οπτικής απορρόφησης ήταν πολύ χαμηλές ($<<1.0$)

4.1.2 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι Τα1/KLH

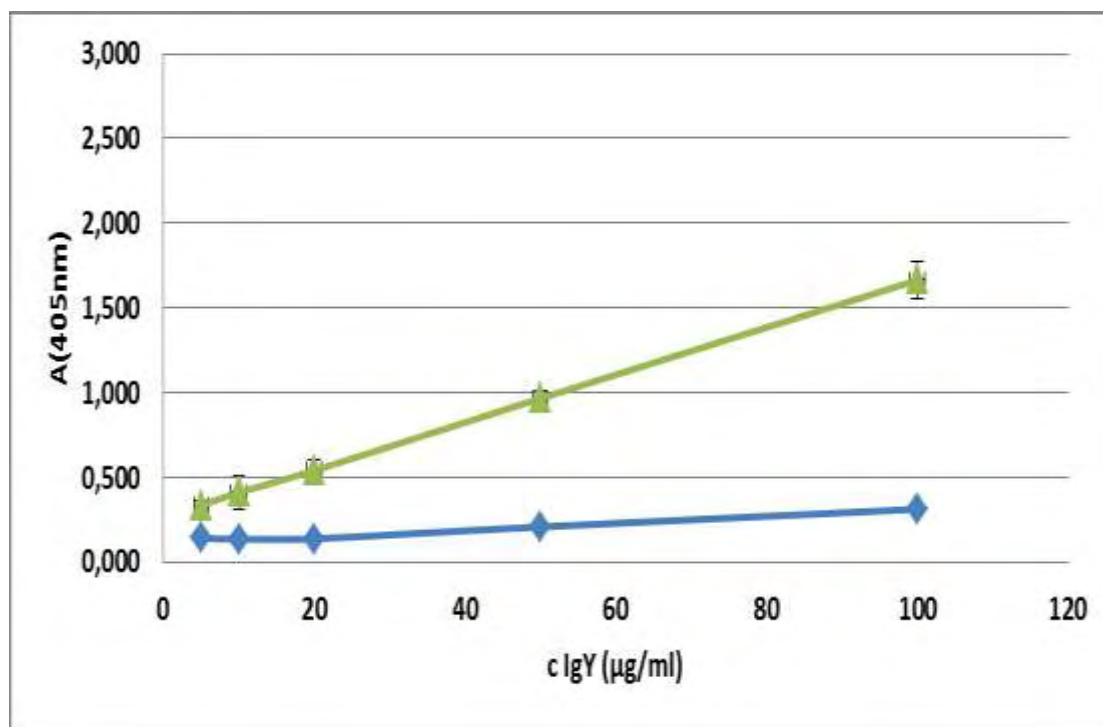
(επίστρωση φρεατίων με διάλυμα Τα1 0,1 $\mu\text{g/ml}$)



Σχήμα 4.2. Καμπύλη τιτλοδότησης ELISA των αντισωμάτων Υ με κωδικό IgY1 (\square), ως προς Τα1. «Μη-άνοση» IgY (\diamond) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Σε δύο συγκεντρώσεις IgY1 (50 και 100 $\mu\text{g/mL}$), η οπτική απορρόφηση πλησίασε ή ξεπέρασε, αντίστοιχα, την τιμή 1.0.

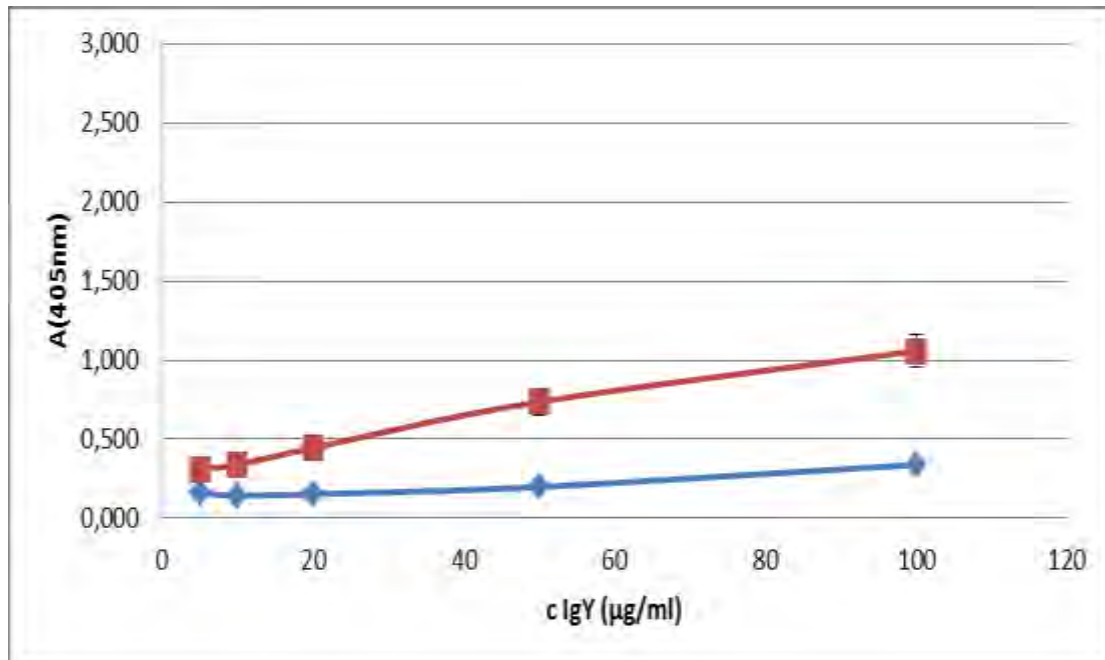
4.1.3 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProTa (επίστρωση φρεατίων με διάλυμα ProTa 0,1 µg/ml)



Σχήμα 4.3. Καμπύλη τιτλοδότησης ELISA των αντισωμάτων Υ με κωδικό IgY2 (\square), ως προς ProTa. «Μη-άνοση» IgY (\diamond) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Σε δύο συγκεντρώσεις IgY2 (50 και 100 $\mu\text{g/mL}$), η οπτική απορρόφηση πλησίασε ή ξεπέρασε, αντίστοιχα, την τιμή 1.0.

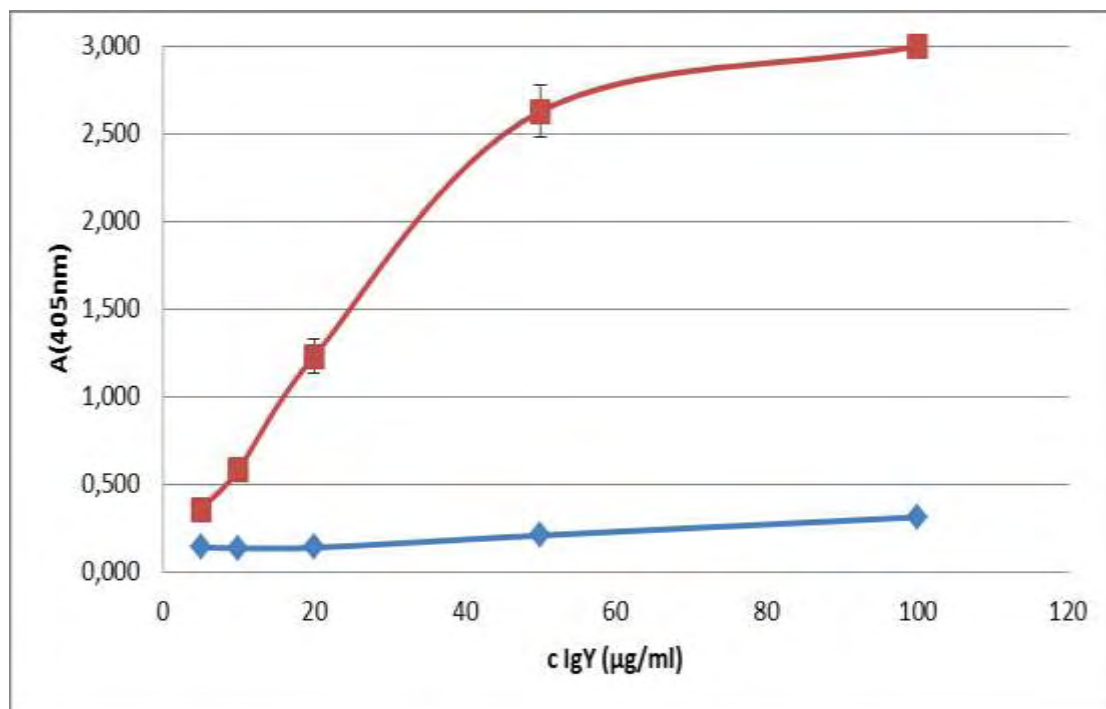
4.1.4 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProTa με (επίστρωση πλακιδίων με διάλυμα Τα1 0,1 µg/ml)



Σχήμα 4.4. Καμπύλη τιτλοδότησης ELISA των αντισωμάτων Υ με κωδικό IgY2 (□), ως προς Τα1. «Μη-άνοση» IgY (◇) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση IgY2 (100 µg/mL), η οπτική απορρόφηση πλησίασε την τιμή 1.0.

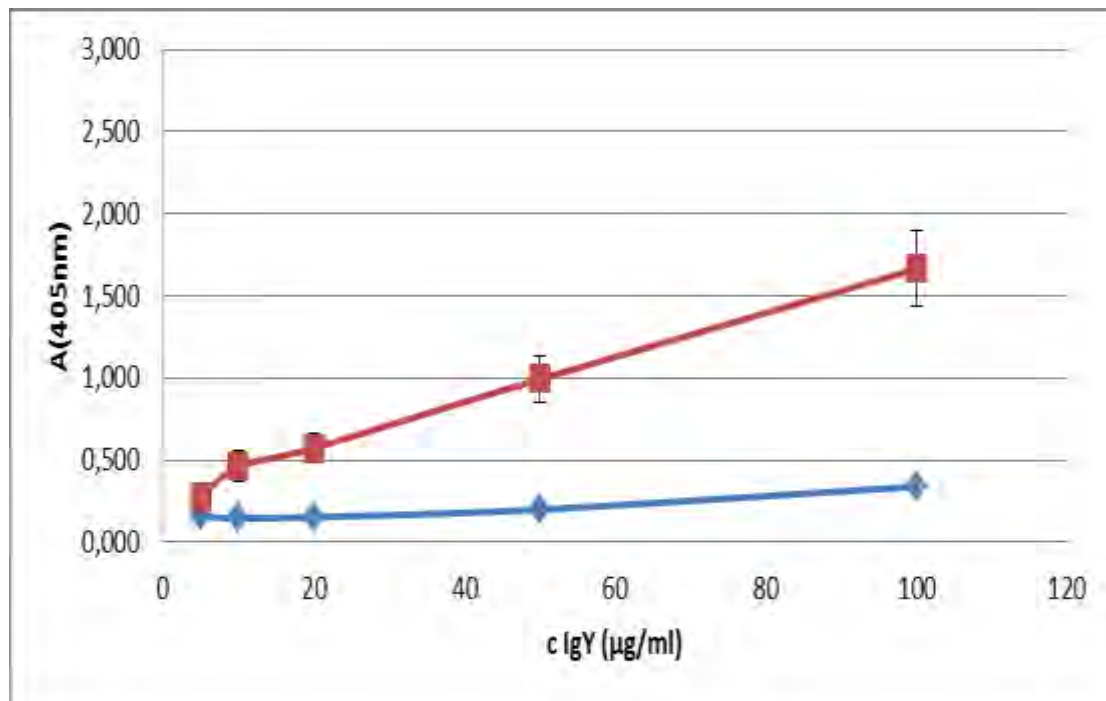
4.1.5 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProTa/KLH (επίστρωση φρεατίων με διάλυμα ProTa 0,1 µg/ml)



Σχήμα 4.5. Καμπύλη τιτλοδότησης ELISA των αντισωμάτων Υ με κωδικό IgY3 (□), ως προς ProTa. «Μη-άνοση» IgY (◇) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Για τις περισσότερες συγκεντρώσεις IgY3, η οπτική απορρόφηση ξεπέρασε την τιμή 1.0. Συγκεκριμένα, συγκέντρωση <20 µg/ml οδήγησε σε τιμή οπτικής απορρόφησης ~1.0, ενώ υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης οδήγησαν, αντίστοιχα, σε πολύ υψηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης.

4.1.6 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProTa/KLH (επίστρωση φρεατίων με διάλυμα Τα1 0,1 µg/ml)

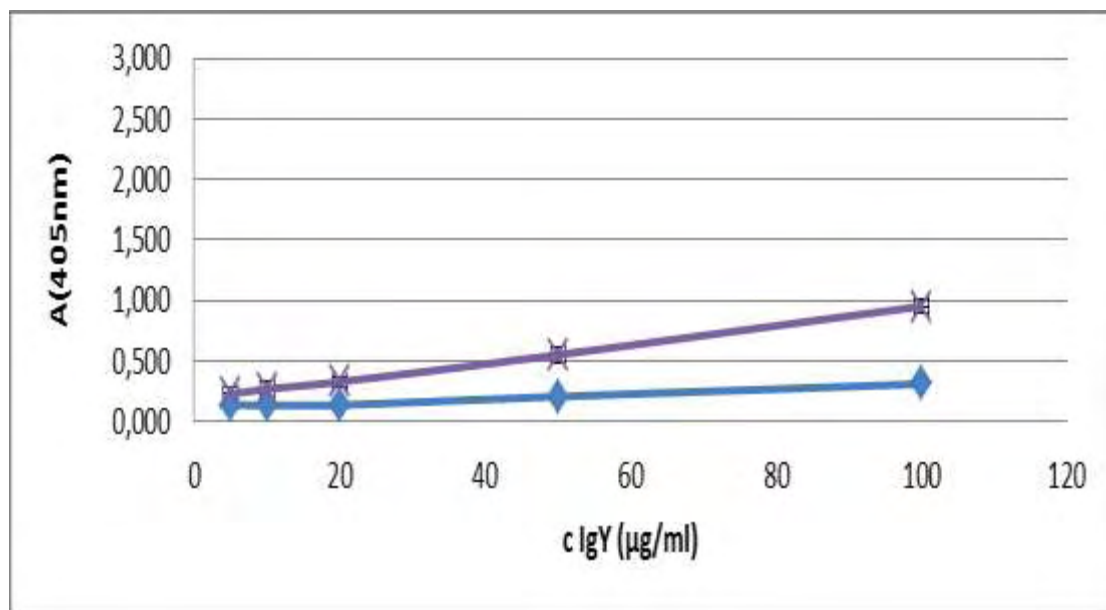


Σχήμα 4.6. Καμπύλη τιτλοδότησης ELISA των αντισωμάτων Υ με κωδικό IgY3 (□), ως προς Τα1. «Μη-άνοση» IgY (◇) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Σε δύο συγκεντρώσεις IgY3 (50 και 100 µg/mL), η οπτική απορρόφηση πλησίασε ή ξεπέρασε, αντίστοιχα, την τιμή 1.0.

4.1.7 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProΤα[100-109]/KLH

(επίστρωση φρεατίων με διάλυμα ProΤα 0,1 µg/ml)

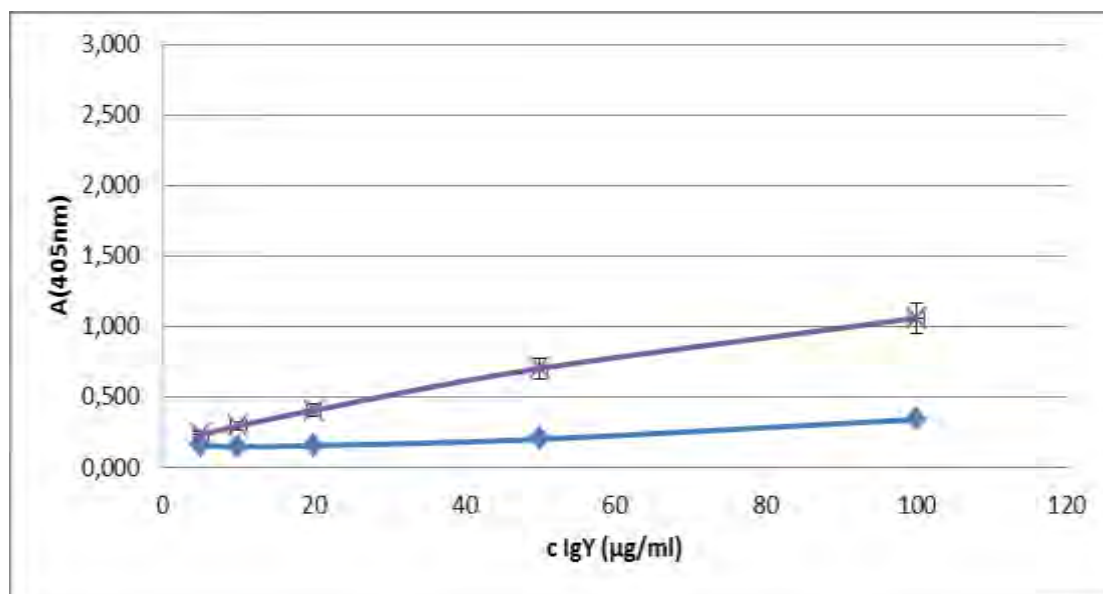


Σχήμα 4.7. Καμπύλη τιτλοδότησης ELISA των αντισωμάτων Υ με κωδικό IgY4 (□), ως προς ProΤα. «Μη-άνοση» IgY (◇) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση IgY4 (100 µg/mL), η οπτική απορρόφηση πλησίασε την τιμή 1.0.

4.1.8 Τιτλοδότηση αντισωμάτων Υ έναντι ProΤα[100-109]/KLH

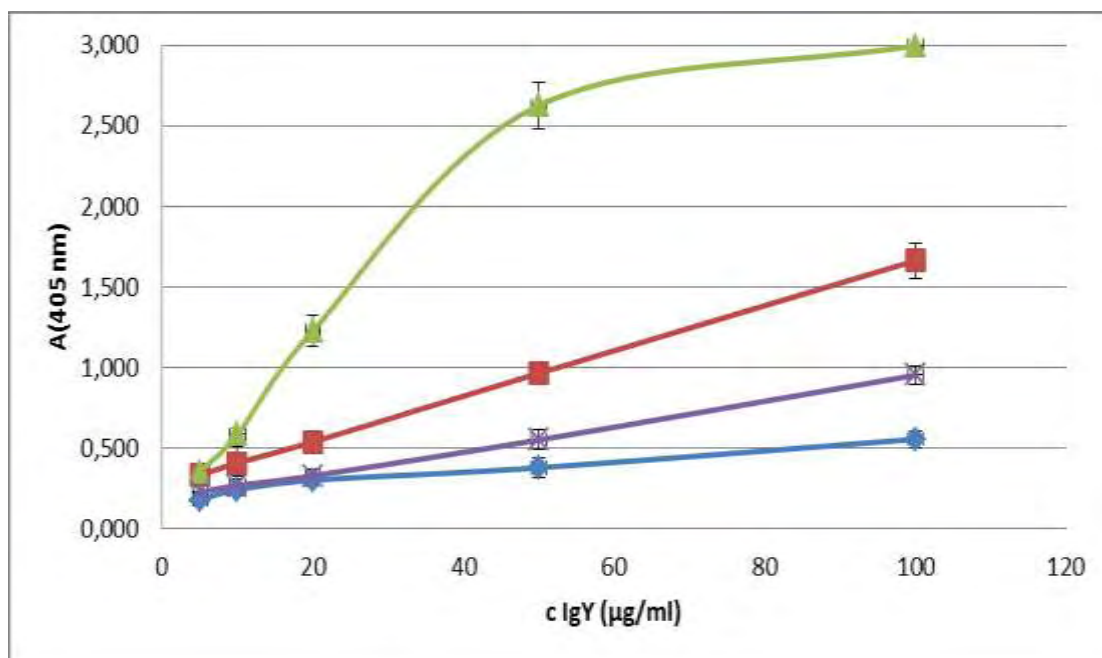
(επίστρωση φρεατίων με διάλυμα Τα1 0,1 µg/ml)



Σχήμα 4.8. Καμπύλη τιτλοδότησης ELISA των αντισωμάτων Υ με κωδικό IgY4 (□), ως προς Τα1. «Μη-άνοση» IgY (◇) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Στην υψηλότερη συγκέντρωση IgY4 (100 µg/mL), η οπτική απορρόφηση πλησίασε την τιμή 1.0.

4.1.9 Συγκεντρωτικό διάγραμμα με τις καμπύλες τιτλοδότησης όλων των αντισωμάτων Υ ως προς ProTa (επίστρωση φρεατίων με διάλυμα ProTa 0,1 $\mu\text{g/ml}$)



Σχήμα 4.9. Καμπύλες τιτλοδότησης ELISA των αντισωμάτων Υ με κωδικούς IgY1 (\diamond), IgY2 (\square), IgY3 (\triangle) και IgY4 (\times), ως προς ProTa.

Τα αντισώματα Υ με κωδικό IgY3 φαίνεται να διαθέτουν τον υψηλότερο τίτλο (κατά παραδοχή: $<20 \mu\text{g/ml}$), ενώ ακολουθούν τα αντισώματα IgY2 (κατά παραδοχή: $50 \mu\text{g/ml}$). Αντίθετα, υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, τα IgY1 και IgY4 οδήγησαν σε σημαντικά χαμηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης ($\leq 1,0$).

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πολυπεπτίδιο προθυμοσίνη άλφα (ProTa) απομονώθηκε αρχικά από θύμο αδέννα. Ο θύμος αδέννας είναι πρωτογενές λεμφικό όργανο του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, ο θύμος παρέχει το περιβάλλον όπου τα T- λεμφοκύτταρα αποκτούν αντιγονική εξειδίκευση και όπου παράγονται ποικίλοι βιολογικά δραστικοί παράγοντες. Η ProTa απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1984 από τους Haritos και συνεργάτες, συγκεκριμένα από θύμο αδέννα αρουραίου. Αυτής της απομόνωσης προηγήθηκε, κατά τη δεκαετία του 1960, η απομόνωση (μετά από βιοχημική κατεργασία πέντε σταδίων) ενός εκχυλίσματος βόειου θύμου αδέννα με ανοενοισχυτική δράση, γνωστού και ως θυμοσινικού κλάσματος 5 (TF5). Το TF5 αρχικά θεωρήθηκε πως περιείχε ένα πολυπεπτίδιο, εν συνεχεία όμως αποδείχθηκε πως περιείχε 30-40 διακριτά πεπτίδια, που ονομάστηκαν θυμοσίνες. Η πρώτη θυμοσίνη που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή και ταυτοποιήθηκε ήταν η θυμοσίνη άλφα (Ta1), ένα όξινο πεπτίδιο 28 αμινοξέων με ανοσοενοισχυτική δράση έως και 1000 φορές ισχυρότερη ολόκληρου του TF5. Το πολυπεπτίδιο ProTa, που όπως αναφέρθηκε απομονώθηκε αργότερα από θύμο αδέννα αρουραίου, ονομάστηκε έτσι λόγω του ότι η αμινοξική αλληλουχία των πρώτων 28 N-τελικών αμινοξέων του ταυτιζόταν με την αλληλουχία της Ta1, και έτσι θεωρήθηκε ως πρόδρομο μόριο της Ta1. Έως σήμερα, ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν πως η Ta1 προκύπτει από την ProTa μόνο *in vitro*, δηλαδή κατά τη διαδικασία απομόνωσης της ProTa από το αντίστοιχο, πρωτογενές βιολογικό υλικό, ενώ άλλοι πιστεύουν πως η Ta1 αποτελεί προϊόν πρωτεόλυσης της ProTa εντός του κυττάρου.

Παρόλο που αρχικά θεωρήθηκε ορμόνη του θύμου αδέννα, σήμερα είναι γνωστό ότι η ProTa εκφράζεται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα των θηλαστικών. Ως προς τον υποκυτταρικό της εντοπισμό, η ProTa είναι ένα πυρηνικό πολυπεπτίδιο. Μάλιστα, η πρωτοταγής δομή της διαθέτει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), ενώ αποτελεί εξαιρετικά όξινο μόριο, με ισοηλεκτρικό σημείο 3,55, όπως οι περισσότερες πυρηνικές πρωτεΐνες. Παρόλο που σειρά πειραμάτων έχουν αποδείξει τον πυρηνικό εντοπισμό της ProTa, πιθανολογείται πως το πολυπεπτίδιο

μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Στον πυρήνα, έχει αναφερθεί ότι η ProTa επιτελεί ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, μέσω της αλληλεπίδρασης του κεντρικού όξινου τμήματος του πολυπεπτιδίου με την ιστόνη H1. Με αυτόν, πιθανώς, τον τρόπο, η ProTa εμπλέκεται στις διαδικασίες αντιγραφής του DNA και μεταγραφής των γονιδίων. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της ProTa έχουν αναφερθεί στην περίπτωση αρκετών ειδών καρκίνου. Ακόμη, η ProTa εμπλέκεται στους μηχανισμούς της απόπτωσης, όπου δρα ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας, ενώ φαίνεται να ενέχεται στην επαγωγή κυτταροπροστατευτικών μηχανισμών έναντι του οξειδωτικού stress. Ο τόσο καίριος ρόλος του πολυπεπτιδίου στην επιβίωση του κυττάρου εξηγεί και τον μεγάλο βαθμό συντήρησης της δομής του στα διάφορα είδη των θηλαστικών.

Εκτός από τις ενδοκυτταρικές της λειτουργίες, η ProTa διαθέτει και εξωκυτταρική δράση, όπως είναι σήμερα κοινώς αποδεκτό και παρόλο που η δράση αυτή είχε αμφισβητηθεί για ένα διάστημα. Η εξωκυτταρική δράση της ProTa έχει συνδεθεί με τους μηχανισμούς ανοσοενίσχυσης. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με παλαιότερα πειραματικά δεδομένα, η χορήγηση ProTa προστάτευσε ποντικούς που είχαν υποστεί ανοσοκαταστολή λόγω ευκαιριακών λοιμώξεων με *Candida albicans* και προκάλεσε επαγωγή της έκκρισης του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων. Σύμφωνα με ερευνητικά ευρήματα των τελευταίων χρόνων, το πολυπεπτίδιο πιθανόν να οφείλει την ανοσοδραστικότητά του στο C – τελικό δεκαπεπτίδιο (ProTa[100-109]), ενώ ανοσοδραστική θεωρείται από πολλούς ερευνητές και η N-τελική περιοχή, που ταυτίζεται με το 28-πεπτίδιο Ta1. Οι υποδοχείς μέσω των οποίων η ProTa ασκεί την εξωκυτταρική της δράση δεν έχουν μέχρι στιγμής ταυτοποιηθεί, πιστεύεται όμως ότι είναι υποδοχείς της οικογένειας TLR.

Συνοπτικά, η ProTa είναι ένα ενδογενές πολυπεπτίδιο με καίριο βιολογικό ρόλο, τόσο ενδοκυτταρικό, όσο και εξωκυτταρικό, καθώς και με μεγάλες δυνατότητες αξιοποίησης στο πεδίο της διάγνωσης ή/και της θεραπείας ασθενειών. Τα παραπάνω εξηγούν το μεγάλο ενδιαφέρον των ερευνητών να μελετήσουν παραπέρα την ProTa,

χρησιμοποιώντας, μεταξύ άλλων, ανοσοχημικές μεθόδους ποιοτικής ανίχνευσης ή/και ποσοτικού προσδιορισμού του μορίου σε βιολογικά δείγματα με ειδικό ενδιαφέρον. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων για την ProTa.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η πρωτοταγής δομή της ProTa παρουσιάζει μεγάλη συντήρηση μεταξύ των διαφόρων ειδών θηλαστικών. Συνεπώς, η ανάπτυξη αντισωμάτων υψηλού τίτλου και υψηλής χημικής συγγένειας έναντι του πολυπεπτιδίου, σε διάφορα είδη θηλαστικών, φαίνεται να παρουσιάζει πρακτικές δυσκολίες. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι παρά το σχετικά υψηλό M.B. του (~12 kDa), το πολυπεπτίδιο οδηγεί σε ανάπτυξη αντισωμάτων μόνον όταν χορηγηθεί στο θηλαστικό – ξενιστή αφότου συζευχθεί σε ειδική πρωτεΐνη-φορέα, όπως, δηλαδή συμβαίνει και με τα μόρια μικρού M.B. (απτένια). Παρά τις δυσκολίες, ωστόσο, αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν μέχρι στιγμής κατορθώσει να αναπτύξουν αντισώματα έναντι της ProTa, ενώ μικρός αριθμός αντισωμάτων κυκλοφορεί και στο εμπόριο. Όλα τα παραπάνω αντισώματα, πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά, ανήκουν στην τάξη IgG (αντισώματα θηλαστικών).

Με στόχο την ανάπτυξη υψηλής χημικής συγγένειας και υψηλού τίτλου αντισωμάτων για την ProTa, αναπτύχθηκαν κατά την τελευταία δεκαετία σε πτηνά (όρνιθες ωτοκίας) αντισώματα Υ από ερευνητές του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Σε σχέση με την ανοσοποίηση θηλαστικών, η ανοσοποίηση πτηνών πιστεύεται ότι, λόγω της φυλογενετικής απόστασης, έχει περισσότερες πιθανότητες να οδηγήσει στην ανάπτυξη υψηλής χημικής συγγένειας και υψηλού τίτλου αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών/ πολυπεπτιδίων των θηλαστικών, ιδιαίτερα όταν αυτά παρουσιάζουν υψηλή συντήρηση δομής ανάμεσα στα θηλαστικά, όπως συμβαίνει με την ProTa.

Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα Υ:

- 1. anti-ProTa[1-28]/KLH ή anti-Ta1/KLH (IgY1)
- 2 .anti-ProTa (IgY2)
- 3. anti-ProTa/KLH (IgY3)
- 4. anti-ProTa[100-109]/KLH (IgY4)

Τα IgY1 και IgY4 αναπτύχθηκαν εναντίον συνθετικών πεπτιδίων από την αμινοξική αλληλουχία της ProTa (τμήματα [1-28] και [100-109], αντίστοιχα), μετά από σύζευξή τους στην εμπορικά διαθέσιμη πρωτεΐνη-φορέα αιμοκυανίνη του θαλάσσιου ασπόνδυλου οργανισμού Keyhole limpet (keyhole limpet haemocyanin, KLH), η οποία θεωρείται ιδιαίτερα ανοσογονική. Τα συνθετικά πεπτίδια παρασκευάστηκαν στα εργαστήρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», βάσει της Fmoc/tBu μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση. Τα IgY3 αναπτύχθηκαν εναντίον του ακέραιου πολυπεπτιδίου, μετά από σύζευξή του σε KLH, ενώ τα IgY2 αναπτύχθηκαν εναντίον αυτούσιου του πολυπεπτιδίου, σε ασύζευκτη μορφή.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αρχική αξιολόγηση των παραπάνω αντισωμάτων Υ. Για την αξιολόγηση των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων τιτλοδότησης ELISA. Ακριβέστερα, τιτλοδοτήθηκαν εμπλουτισμένα παρασκευάσματα των παραπάνω αντισωμάτων. Κατά τις τιτλοδοτήσεις χρησιμοποιήθηκαν δύο πειραματικά πρωτόκολλα, των οποίων η μόνη διαφορά έγκειται στο μόριο που επιστρώνεται στα φρεάτια ELISA (ProTa ή, επικουρικά, Τα1).

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, τα αντισώματα IgY3 (και, δευτερευόντως, τα IgY2) φαίνεται να διαθέτουν τους υψηλότερους τίτλους, ως προς την ProTa, και προτείνεται να αξιολογηθούν περαιτέρω. Αξίζει, μάλιστα, να σημειωθεί ότι τα αντισώματα IgY2 αναπτύχθηκαν εναντίον ProTa, χωρίς να έχει προηγηθεί σύζευξη του πολυπεπτιδίου σε πρωτεΐνη-φορέα. Αντίθετα, τα αντισώματα IgY1 και IgY4 φαίνεται να διαθέτουν σημαντικά χαμηλότερους τίτλους και δεν θεωρούνται αξιοποιήσιμα, τουλάχιστον στην παρούσα τους μορφή. Επίσης, τα αντισώματα IgY3 (καθώς και τα IgY1) φαίνεται να αναγνωρίζουν, σε ένα βαθμό, και την Τα1, ωστόσο αυτό μένει να αποδειχθεί με πειράματα εκτόπισης ELISA (ELISA displacement experiments), παρουσία ελεύθερης Τα1 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα αντισώματα IgY4 έδωσαν σχετικά χαμηλές τιμές οπτικής απορρόφησης, τόσο σε φρεάτια που είχαν επιστρωθεί με ProTa όσο και σε φρεάτια επιστρωμένα με Τα1 (που πιθανόν προκύπτουν από μη-

ειδικές αλληλεπιδράσεις) και μπορούν να θεωρηθούν ως τα λιγότερο αξιοποιήσιμα από τα αντισώματα που μελετήθηκαν.

Συνοψίζοντας, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων τιτλοδότησης ELISA προκύπτει ότι:

- Τα αντισώματα Υ έναντι ProTa/KLH (IgY3) φαίνεται να αναγνωρίζουν αποτελεσματικά το πολυπεπτίδιο ProTa, εμφανίζοντας τον υψηλότερο τίτλο μεταξύ των αντισωμάτων που αξιολογήθηκαν. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από τα αποτελέσματα πρόσφατων πειραμάτων εκτόπισης ELISA, που δεν παρουσιάζονται εδώ και έδειξαν μείωση του οπτικού σήματος παρουσία ελεύθερης ProTa σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις.
- Τα παραπάνω αντισώματα, μετά από περαιτέρω αξιολόγηση, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ανοσοχημικές μεθόδους (ανοσοϊστοχημείας, ανοσοκυτταρολογίας, ανοσοαναλύσεις, αναλύσεις Western blot, κ.λπ.), με στόχο την περαιτέρω μελέτη της ProTa. Για παράδειγμα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε sandwich ELISA, σε συνδυασμό με αντισώματα της τάξης IgG, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ProTa σε ποικίλα βιολογικά δείγματα. Απώτερος στόχος των μελετών γύρω από την ProTa είναι αποσαφηνιστεί ο τρόπος δράσης του πολυπεπτιδίου (π.χ. μέσω ποιων υποδοχέων) και, πιθανόν, να αυξηθούν οι προοπτικές αξιοποίησής του τόσο σε διαγνωστικό επίπεδο (πιθανός καρκινικός δείκτης), όσο και σε θεραπευτικό (ανοσοενισχυτικός παράγοντας).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γενική Βιβλιογραφία

- I. Μαρία-Ελισσάβετ Βασιλειάδου. Πτυχιακή Εργασία: Αξιολόγηση εργαστηριακών εργαλείων για τη μελέτη του πολυπεπτιδίου προθυμοσίνη άλφα (ProTa). Λάρισα 2017, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- II. Περσεφόνη Π. Κλημέντζου, Ερευνητική εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης: Ανάπτυξη, καθαρισμός και χαρακτηρισμός αντισωμάτων IgY εναντίον Προθυμοσίνης άλφα, Αθήνα 2002, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ.
- III. Deshpante SS. Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development. Chapman & Hall, NY USA, 1996.
- IV. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. Ανοσολογία (Πέμπτη έκδοση), Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα 2007
- V. Härtle S, Magor KE, Göbel TW, Davison F, Kaspers B. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: KA Shat, B Kaspers, P. Kaiser (Eds) Avian Immunology, Elsevier, 2014, 2nd Edition.
- VI. Schade R, Behn I, Erhard M, Hlinak A, Staak C. Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY-technology. Berlin, Heidelberg: Springer – Verlag, 2001
- VII. Zdrojewicz Z, Pachura E, Pachura P. The thymus: A Forgotten, but very important organ. Adv Clin Exp Med 2016; 25: 369-375

Ειδική Βιβλιογραφία

1. Cooper MD, Peterson RDA, Good RA. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. Nature 1966; 205: 143-146
2. Goldstein AL, Slate FDr, White A. Preparation, assay and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin), Proc Natl Acad Sci USA 1966; 56: 1010-1017
3. Wara, DW, Goldstein AL, Doyce NE, Amman AJ. Thymosin activity in patients with cellular immunodeficiency. N Engl J Med 1975; 292: 70-74
4. Goldstein AL, Guha A, Zatz MM, Hardy MA, White A. Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymous gland. Proc Natl Acad Sci USA 1972; 69: 1800-1803
5. Low TL, Goldstein AL. Thymic hormones: An overview. Methods Enzymol 1985; 116: 213-219
6. Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, McClure J, Thurman GB, Rossio J, Lai CY, Chang D, Wang SS, Harvey C, Ramel AH, Meienhofer J. Thymosin alpha1: isolation and

sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 725-729

7. Caldarella J, Goodall GJ, Felix AM, Heimer EP, Salvin SB, Horecker BL. Thymosin alpha 11: A peptide related to thymosin alpha 1 isolated from calf thymosin fraction 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 7424-7427
8. Haritos AA, Goodall GJ, Horecker BL. Prothymosin alpha: Isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1008-1011
9. Haritos AA, Blacher R, Stein S, Caldarella J, Horecker BL. Primary structure of rat thymus prothymosin alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82: 343-346
10. Sarandeses CS, Covelo G, Diaz-Jullien C, Freire M. Prothymosin α is processed to thymosin $\alpha 1$ and thymosin $\alpha 11$ by a lysosomal asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem* 2003; 278: 13286-13293
11. Pan LX, Haritos AA, Wideman J, Komiyama T, Chang M, Stein S, Salvin SB, Horecker BL. Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys* 1986; 250: 197-201
12. Szabo P, Panneerselvam C, Clinton M, Frangou-Lazaridis M, Weksler D, Whittington E, Macera MJ, Grzeschik KH, Selvakumar A, Horecker BL. Prothymosin alpha gene in humans: Organization of its promoter region and localization to chromosome 2. *Hum Genet* 1993; 90: 629-634.
13. Piñeiro A, Cordero OJ, Nogueira M. Fifteen years of prothymosin alpha: Contradictory past and new horizons. *Peptides* 2000; 21: 1433-46
14. Haritos AA, Tsolas O, Horecker BL. Distribution of prothymosin alpha in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1391-1393.
15. Hannappel E, Huff T. The thymosins. Prothymosin alpha, parathymosin, and beta thymosins: Structure and function. *Vitam Horm* 2003; 66: 257-296.
16. Manrow RE, Sburlati AR, Hanover JA, Berger SL. (1991). Nuclear targeting of prothymosin alpha. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 3916-3924
17. Rubtsov Y, Vartapetian A. Lysine -87 is a functional important residue in human prothymosin alpha. *FEBS Lett* 1996; 397: 215-218
18. Gómez-Márquez J, Segade F. Prothymosin alpha is a nuclear protein. *FEBS Lett*. 1988; 226: 217-219
19. Manrow RE, Sburlati AR, Hanover JA, Berger SL. Nuclear targeting of prothymosin alpha. *J Biol Chem* 1991; 266: 3916-24
20. Enkemann SA, Ward RD, Berger SL. Mobility within the nucleus and neighboring cytosol is a key feature of prothymosin-alpha. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 1341-1355.

21. Freire J, Covelo G, Sarandeses C, Díaz-Jullien C, Freire M. Identification of nuclear-import and cell-cycle regulatory proteins that bind to prothymosin alpha. *Biochem Cell Biol.* 2001; 79: 123-131
22. Eilers M, Schirm S, Bishop JM. The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* 1991; 10: 133-141
23. Papamarcaki T, Tsolas O. Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett* 1994; 345: 71-75
24. Segade F, Gomez-Marquez J. Prothymosin alpha, *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1243-1248
25. Karetso Z, Kretsovali A, Murphy C, Tsolas O, Papamarcaki T. Prothymosin alpha interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. *EMBO Rep* 2002; 3: 361-366.
26. Subramanian C, Hasan S, Rowe M, Hottiger M, Orre R, Robertson ES. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol* 2002; 76: 4699-4708
27. Καππά Ν, Williams E, Ιωάννου Κ, Σαμαρά Π, Τσιτσιλώνη Ο. Η προθυμοσίνη α ως καρκινικός βιοδείκτης και ανοσοθεραπευτικό μόριο. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2013; 30: 406-419
28. Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, Chichkova NV, Filonov GS, Rubtsov YP, Sukhacheva EA, Melnikov SV, Schneider U, Wanker EE, Vartapetian AB. Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1089-1099
29. Khan H, Cino EA, Brickenden A, Fan J, Yang D, Choy WY. Fuzzy complex formation between the intrinsically disordered prothymosin α and the Kelch domain of Keap1 involved in the oxidative stress response. *J Mol Biol* 2013; 425: 1011-1027
30. Qi X, Wang L, Du F. Novel small molecules relieve prothymosin alpha-mediated inhibition of apoptosome formation by blocking its interaction with Apaf-1. *Biochemistry* 2010; 49: 1923-1930
31. Ioannou K, Samara P, Livaniou E, Derhovanessian E, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha: A ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 599-614
32. Kashat L, So AK, Masui O, Wang XS, Cao J, Meng X, Macmillan C, Ailles LE, Siu KW, Ralhan R, Walfish PG. Secretome-based identification and characterization of potential biomarkers in thyroid cancer. *J Proteome Res* 2010; 9: 5757-5769
33. Letsas KP, Vartholomatos G, Tsepi C, Tsatsoulis A, Frangou-Lazaridis M. Fine-needle aspiration biopsy-RT-PCR expression analysis of prothymosin alpha and parathymosin in thyroid: Novel proliferation markers? *Neoplasma* 2007; 54: 57-62
34. Tsitsiloni OE, Stiakakis J, Koutselinis A, Gogas J, Markopoulos C, Yialouris P, Bekris S, Panoussopoulos D, Kiortsis V, Voelter W, Haritos AA. Expression of alpha-thymosins in human tissues in normal and abnormal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9504-9507

35. Ojima E, Inoue Y, Miki C, Mori M, Kusunoki M. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal cancer to preoperative radiotherapy. *J Gastroenterol* 2007; 42: 730-736
36. Fraga M, García-Caballero T, Domínguez F, Pérez-Becerra E, Beiras A, Forteza J. Immunohistochemical location of prothymosin alpha in regenerating human hepatocytes and hepatocellular carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 423: 449-452
37. Wu CG, Habib NA, Mitry RR, Reitsma PH, van Deventer SJ, Chamuleau RA. Overexpression of hepatic prothymosin alpha, a novel marker for human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1997; 6: 1199-1204
38. Sasaki H, Sato Y, Kondo S, Fukai I, Kiriyama M, Yamakawa Y, Fujii Y. Expression of the prothymosin alpha mRNA correlated with that of N-myc in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2001; 168: 191-195
39. Jou YC, Tung CL, Tsai YS, Shen CH, Syue-Yi C, Shiau AL, Tsai HT, Wu CL, Tzai TS. Prognostic relevance of prothymosin-alpha expression in human upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 2009; 74: 951-957
40. Tsitsiloni OE, Stiakakis J, Koutselinis A, Gogas J, Markopoulos C, Yialouris P, Bekris S, Panoussopoulos D, Kiortsis V, Voelter W, Haritos AA. Expression of alpha-thymosins in human tissues in normal and abnormal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9504-9507
41. Mori M, Barnard GF, Staniunas RJ, Jessup JM, Steele GD Jr, Chen LB. Prothymosin-alpha mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer. *Oncogene* 1993; 8: 2821-2826
42. Skopeliti M, Voutsas I, Klimentzou P, Tsiatas ML, Beck A, Bamias A, Moraki M, Livaniou E, Neagu M, Voelter W, Tsitsilonis OE. The immunologically active site of prothymosin α is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1247-1257
43. Samara P, Ioannou K, Neagu M, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Voelter W, Tsitsilonis O. The C-terminal decapeptide of prothymosin α is responsible for its stimulatory effect on the functions of human neutrophils in vitro. *Int Immunopharmacol* 2013; 15: 50-57
44. Piñeiro A, Begoña Bugia M, Pilar Arias M, Cordero OJ, Nogueira M. Identification of receptors for prothymosin alpha on human lymphocytes. *Biol Chem* 2001; 382: 1473-1482
45. Salgado FJ, Piñeiro A, Canda-Sánchez A, Lojo J, Nogueira M. Prothymosin alpha-receptor associates with lipid rafts in PHA-stimulated lymphocytes. *Mol Membr Biol* 2005; 22: 163-176
46. Skopeliti M, Kratzer U, Altenberend F, Panayotou G, Kalbacher H, Stevanovic S, Voelter W, Tsitsilonis OE. Proteomic exploitation on prothymosin α – induced mononuclear cell activation. *Proteomics* 2007; 7: 1814-1824
47. Mosoian A, Teixeira A, Burns CS, Sander LE, Gusella GL, He C, Blander JM, Klotman P, Klotman ME. Prothymosin-alpha inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 10178-10183.

48. Ioannou K, Derhovanessian E, Tsakiri E, Samara P, Kalbacher H, Voelter W, Trougakos IP, Pawelec G, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha and a prothymosin alpha-derived peptide enhance T(H) 1-type immune responses against defined HER-2/neu epitopes. *BMC Immunol* 2013; 14: 43
49. Karachaliou C.-E., Liolios C, Triantis C, Zikos C, Samara P, Tsitsilonis OE, Kalbacher H, Voelter W, Papadopoulos M, Pirmettis I, Livaniou E. Specific in vitro binding of a new ^{99m}Tc-radiolabeled derivative of the C-terminal decapeptide of prothymosin alpha on human neutrophils. *Int J Pharm* 2015; 486: 1-12
50. Salvin SB, Horecker BL, Pan LX, Rabin BS. The effect of dietary zinc and prothymosin alpha on cellular immune responses of RF/J mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 43: 281-288
51. Maric D, Veljic J, Ranin J, Jankovic BD. In vivo effect of prothymosin-alpha 1 on humoral and cell-mediated immune responses in the young rat. *Int J Neurosci* 1991; 59: 135-142
52. Pan LX, Haritos AA, Wideman J, Komiyama T, Chang M, Stein S, Salvin SB, Horecker BL. Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys* 1986; 250: 197-201
53. Cordero OJ, Sarandeses CS, López JL, Nogueira M. Prothymosin alpha enhances human natural killer cell cytotoxicity: Role in mediating signals for NK activity. *Lymphokine Cytokine Res* 1992; 11: 277-285
54. López-Rodríguez JL, Cordero OJ, Sarandeses C, Viñuela J, Nogueira M. Interleukin-2 killer cells: In vitro evaluation of combination with prothymosin alpha. *Lymphokine Cytokine Res* 1994; 13: 175-182
55. Skopeliti M, Iconomidou VA, Derhovanessian E, Pawelec G, Voelter W, Kalbacher H, Hamodrakas SJ, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha immunoactive carboxyl-terminal peptide TKKQKTDEDD stimulates lymphocyte reactions, induces dendritic cell maturation and adopts a beta-sheet conformation in a sequence-specific manner. *Mol Immunol* 2009; 46: 784-792
56. Reclos GJ, Baxevanis CN, Sfagos C, Papageorgiou C, Tsokos GC, Papamichail M. Multiple sclerosis: Effects of prothymosin alpha on the autologous and allogeneic MLR in patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1987; 70: 336-344
57. Jin Y, Cao C, Li P, Liu X, Huang W, Li C, Ma Q. Boosting immune response to hepatitis B DNA vaccine by coadministration of Prothymosin alpha-expressing plasmid. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1364-1369
58. Heidecke H, Eckert K, Schulze-Forster K, Maurer HR. Prothymosin alpha 1 effects in vitro on chemotaxis, cytotoxicity and oxidative response of neutrophils from melanoma, colorectal and breast tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19: 413-420
59. Freire M, Díaz-Jullien C, Covelo G. Developments in prothymosin α research. In: *Recent Res Devel Proteins*, Transworld Research Network, Kerala, India, pp 257-276, 2002
60. Tzai TS, Tsai YS, Shiau AL, Wu CL, Shieh GS, Tsai HT. Urine prothymosin-alpha as novel tumor marker for detection and follow-up of bladder cancer. *Urology* 2006; 67: 294-299

61. Jou YC, Tsai YS, Hsieh HY, Chen SY, Tsai HT, Chen KJ, Wang ST, Shiau AL, Wu CL, Tzai TS. Plasma thymosin- α 1 level as a potential biomarker in urothelial and renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2013; 31: 1806-1811
62. Costopoulou D, Leondiadis L, Czarnecki J, Ferderigos N, Ithakissios DS, Livaniou E, Evangelatos GP. Direct ELISA method for the specific determination of prothymosin alpha in human specimens. *J Immunoassay* 1998; 19: 295-316
63. Samara P, Kalbacher H, Ioannou K, Radu DL, Livaniou E, Promponas VJ, Voelter W, Tsitsilonis O. Development of an ELISA for the quantification of the C-terminal decapeptide prothymosin α (100-109) in sera of mice infected with bacteria. *J Immunol Methods* 2013; 395: 54-62
64. Tsitsiloni OE, Heimer E, Felix A, Yialouris PP, Vamvoukakis J, Voelter W, Haritos AA. Radioimmunoassays for the C-terminus of prothymosin α and the N-terminus of parathymosin α for the measurement of the levels of α -thymosins in human cancer. *J Immunol Methods* 1994; 169: 163-171
65. Klimentzou P, Drougou A, Fehrenbacher B, Schaller M, Voelter W, Barbatis C, Paravatou-Petsotas M, Livaniou E. Immunocytological and preliminary immunohistochemical studies of Prothymosin α , a human cancer-associated polypeptide with a well-characterized polyclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 1023-1031
66. DiasDaSilva W, Tambourgi DV. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnosis and immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 135: 173-180
67. Engvall, E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8 : 871-874
68. Van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. *FEBS Lett* 1971; 15: 232-236
69. Klimentzou P, Paravatou-Petsotas M, Zikos C, Beck A, Skopeliti M, Czarnecki J, Tsitsilonis O, Voelter W, Livaniou E, Evangelatos GP. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. *Peptides* 2006; 27: 183-193
70. Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* 1990; 35: 161-214
71. Klimentzou P, Beck A, Varvarigou A, Tsitsilonis O, Voelter W, Pirmettis I, Papadopoulos M, Livaniou E, Zikos C. Solid phase synthesis of a peptide derivative of thymosin alpha 1 and initial studies on its ^{99m}Tc —radiolabelling. *Chem Biol Drug Des* 2007; 70: 40-46

ENOETO

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
CBP	CREB-binding protein
CD	Cluster of differentiation
CREB	cAMP response element –binding protein
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
Nrf2	Nuclear factor –like 2
p300	Adenovirus early region 1A binding protein
Ran	RAs –related nuclear protein
Rch-1	LRR(Leucine –rich repeat) receptor –like serine/threonine protein kinase
TRIF	TIR –domain – containing adapter – inducing interferon- β
Keap1	Kealch –like ECH- associated protein 1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor
KLH	Keyhole limpet hemocyanin